EINFLUSS EINER IMMUNSUPPRESSION AUF EINE EXPERIMENTELLE POCKENINFEKTION MIT VERSCHIEDENEN VACCINIA-STÄMMEN

Harald Singer

1979

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie,
Infektions- und Seuchenmedizin
des Fachbereichs Tiermedizin der Universität München
Vorstand: Prof. Dr. Dr. h. c. A. Mayr

EINFLUSS EINER IMMUNSUPPRESSION AUF EINE EXPERIMENTELLE POCKENINFEKTION MIT VERSCHIEDENEN VACCINIA-STÄMMEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
des Fachbereichs Tiermedizin der
Ludwig-Maximilians-Universität München

von

Harald Singer
aus
Hannover

München 1978

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Tiermedizin
der Universität München

Dekan:	Prof. Dr. H. Kräußlich
Referent:	Prof. Dr. Dr.h.c. A. Mayr
Korreferent:	Prof. Dr. H. E. Krampitz

Tag der Promotion: 23. Februar 1979

UNIV. LEIDEN BIBL.

DISSERTATIONS– UND FOTODRUCK FRANK oHG
8 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2 8 0 9 0 9 0

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

		Seite
1.	EINLEITUNG	7
2.	SCHRIFTTUM	9
2.1.	Zellkultur-Marker	11
2.1.1.	FHE-Zellen	11
2.1.2.	Menschliche Zellkulturen	12
2.1.3.	Sonstige Zellsysteme	13
2.1.4.	Interferonbildung	14
2.2.	Hühnerei-Marker	15
2.3.	Versuchstier-Marker (Maus)	17
2.3.1.	Neurovirulenz	17
2.3.2.	Virulenz bei parenteraler Applikation	17
2.4.	Versuchstier-Marker (Kaninchen)	18
2.4.1.	Hautvirulenz	18
2.4.2.	Virulenz bei parenteraler Applikation	18
2.5.	Versuchstier-Marker (Huhn)	19
2.6.	Versuchstier-Marker (Affe)	20
2.6.1.	Neurovirulenz	20
2.6.2.	Hautvirulenz	21
2.6.3.	Virulenz bei parenteraler Applikation	21
2.7.	Eigenschaften der attenuierten Stämme bei der Anwendung am Menschen	23
2.8.	Serologische Eigenschaften der attenuierten Pockenimpfstämme	26
2.9.	DNS-Marker und Molekulargewicht des attenuierten Pockenstammes MVA	29

		Seite
3.	EIGENE UNTERSUCHUNGEN	37
3.1.	Material und Methoden	37
3.1.1.	Zellkulturen	37
3.1.2.	Hühnereier	37
3.1.3.	Versuchstiere	38
3.1.4.	Virusmaterial	38
3.1.5.	Immunsuppression	39
3.1.6.	Serologische Methoden (Antikörpernachweis)	40
3.2.	Versuche und Ergebnisse	43
3.2.1.	Untersuchungen über die Antikörperbildung in röntgenbestrahlten Mäusen nach einer Infektion mit dem Vaccinia-Stamm Elstree	43
3.2.2.	Vergleichende Untersuchungen über den klinischen Verlauf einer Vaccinia-Infektion bei der röntgenbestrahlten Maus	46
4.	DISKUSSION	54
5.	ZUSAMMENFASSUNG	59
6.	SUMMARY	61
7.	LITERATURVERZEICHNIS	63

EINFLUSS EINER IMMUNSUPPRESSION AUF EINE EXPERIMENTELLE POCKENINFEKTION MIT VERSCHIEDENEN VACCINIA-IMPFSTÄMMEN

1. Einleitung

Seitdem die Pockenschutzimpfung nicht mehr staatlich angeordnet wird, muß man daran denken, daß der Populationsschutz gegenüber Pocken bereits heute unzureichend ist und in naher Zukunft noch weiter absinken wird. Menschenpocken gelten zwar als ausgerottet, jedoch besteht die Möglichkeit, daß sich Variola-Virus, der Erreger der Menschenpocken, in einzelnen Gebieten hält ohne erkannt oder registriert zu werden. Zudem bildet auch das Tier, vor allem über das Vaccinia-Virus und möglicherweise das Affenpockenvirus, eine Gefahr für den Menschen (Baxby, 1977; Fenner, 1977).

Als Abwehr und Schutz gegen die verschiedenen Pockenbedrohungen haben die Staaten mit aufgehobener Impfpflicht entsprechende Impfstoffreserven angeschafft. Dies sind Lebendimpfstoffe auf der Basis von Vacciniavirusstämmen, die von der WHO (World Health Organization) empfohlen sind (z.B. Stamm Elstree). Sie werden seit Jahren für die Erst- und Wiederimpfung verwendet und sind mit dem bekannten "Impfrisiko" belastet. Müssen sie zu Massenimpfungen eingesetzt werden, steigt der Prozentsatz von postvakzinalen Komplikationen, von denen besonders die Erstimpflinge betroffen sind, entsprechend an.

In derartigen Notsituationen kann auf Alter und Impffähigkeit keine Rücksicht genommen werden. Sicher werden dann neben Allergikern etc. auch Personen geimpft, die

aufgrund endo- oder exogener Ursachen unter Immunsuppression stehen. Als besonders kraß muß man sich die Situation bei einem Katastrophenfall mit Strahlenbelastung vorstellen.

Es ist daher besonders wichtig, einen Pockenimpfstoff zur Verfügung zu haben, der im Organismus auch unter Bedingungen einer Immunsuppression zu keinen Impfschäden führt und möglichst auch eine belastbare Pockenimmunität aufbaut. Zu diesem Zweck bietet sich generell der Einsatz attenuierter Vaccinia-Stämme an.

Attenuierte Virausstämme haben im Verlauf vieler Passagen im Brutei oder in der Zellkultur ihre Virulenz für das Versuchstier bzw. für den Menschen weitgehend verloren. Es ist aber bisher noch nichts darüber bekannt, ob dieses Kriterium auch für die Bedingungen einer Immunsuppression gilt.

Die vorliegende Arbeit greift diese Frage auf. Sie soll damit einerseits einen Beitrag zum Problem der Pockenschutzimpfung im abwehrgeschwächten Organismus leisten, andererseits die biologischen Eigenschaften verschiedener derzeit zur Verfügung stehender attenuierter Vaccinia-Stämme darstellen.

2. Schrifttum

Attenuierte Pockenimpfstämme, ihre biologischen Eigenschaften (Marker)

Die ersten Versuche zur Abschwächung eines Vaccinia-Virus über Zellkultur-Passagen liegen einige Jahrzehnte zurück (Rivers, 1931). Der "first revived strain" von Rivers entstand nach 34 Hühnerembryofibroblasten - (FHE) und einigen Kaninchenhodenpassagen aus dem über die Kälberhaut gezüchteten Impfvirus. Er zeigte bereits eine verminderte Hautvirulenz bei Kaninchen und wurde als Ausgangsmaterial für den CV_1 - Stamm (Ei-Virus) benützt (Kempe, 1968; John, 1969).

Der "second revived strain" - so bezeichnet nach weiteren 31 FHE- und einigen Kaninchenhodenpassagen - diente v.d. Noordaa (1964) zur Herstellung seiner Eivakzine (CV_2).

Japanische Forscher züchteten aus dem virulenten Stamm DIE (Dairen I) in kontinuierlichen Chorioallantois-Membran (CAM) - Passagen den attenuierten Stamm DIS (Dairen Is) (Kitamura, 1967).

Das von A. Mayr et al. (1975) modifizierte Vaccinia-Virus Ankara (MVA) geht auf den Dermo-Vaccinia-Stamm CVA zurück, der in der Türkei viele Jahre über Kalb-Esel-Kalb-Passagen gezüchtet wurde und dort als Grundlage für den Menschen-Pockenimpfstoff diente. Die Attenuierung erfolgte über 516 FHE-Passagen.

Generell sind also die in diesem Beitrag behandelten attenuierten Pockenimpfstämme über eine Vielzahl von Passagen an bestimmte Wirtsysteme adaptiert und weisen gegenüber dem originären virulenten Stamm veränderte biologische Eigenschaften auf, die sich labortechnisch erfassen lassen. Interessant ist besonders der jeweilige Grad der Virulenz, den die attenuierten Stämme in verschiedenen Systemen (Zellkultur, Versuchstier etc.) erkennen lassen, da man hierdurch und beim Vergleich mit nicht attenuierten Impfstämmen Anhaltspunkte für die Eignung als Impfstoff für den Menschen bekommen kann.

Die für jeden einzelnen Virusstamm spezifischen Marker sollen im folgenden dargestellt werden. Aus Gründen der Beschränkung soll der Verlauf von Belastungsinfektionen (challenge) bei immunisierten Versuchstieren nicht berücksichtigt werden.

2.1. Zellkultur-Marker

2.1.1. FHE-Zellen

Die Stämme CV_1, CV_2 und MVA sind durch eine Reihe von Passagen an Kulturen von primären FHE adaptiert und zeigen in diesem System eine hohe Wachstumsrate. Der auf der CAM passagierte DIS-Stamm erreicht hier ebenfalls hohe Titer, wie in Tabelle 1 dargelegt.

Bei CV_1 fallen im Vergleich zu virulenten Stämmen (Connaught Laboratories = CL und Lederle Chorioallantoic = LCA) die größeren Plaquedurchmesser auf. So beobachtete John (1969), daß 48 Std. nach der Infizierung von Kulturschälchen mit CV_1 größere Plaques auftraten, von denen die 1o größten im Durchschnitt 33 mm maßen (bei 2o-facher Vergrößerung); die entsprechenden Werte der Vergleichsstämme lagen bei 24 mm (CL) und 21 mm (LCA). Nach Tint und Bierly (1969) erreicht CV_1 auf FHE einen Titer von $1o^{6,84}$ $KID_{5o/ml}$ (5o % Kulturinfektiöse Dosen).

CV_2 vermehrt sich etwas weniger stark in FHE, so daß der Titer bei $1o^6$ IU/ml (infectious units) anzusetzen ist (v.d. Noordaa, 1964).

Bei DIS erreicht die Vermehrungskurve bereits nach 3o Std. ihr Maximum, der virulente Vergleichsstamm DIE benötigt hierbei 72 Std. (Kitamura et al., 1967). Nach Tagaya et al. (1973) erreicht das DIS-Virus (25. CAM-Passage) in FHE eine Titerhöhe von $1o^{8,2}$ $KID_{5o/ml}$ und bildet typische Plaques aus.

Das modifizierte Vaccinia-Virus Ankara unterscheidet sich nur gering vom virulenten Ausgangsstamm hinsichtlich der Vermehrungsrate in FHE. Diese ist bei beiden hoch und führt zur Lysis des Zellrasens. Wohl aber sind qualitative Unterschiede bezüglich des cytopathischen Effektes (CPE) bemerkenswert: Läßt das virulente CVA-Virus einen aggressiven CPE mit scholliger Degeneration und Zellverschmelzung erkennen, so kommt es bei MVA zu isolierter kleiner Abkugelung mit granulärem Zerfall der Zellen. Zellverschmelzung und Synzytienbildung werden nicht beobachtet. Die Fähigkeit zur Plaquebildung ist gut ausgeprägt (Mayr et al., 1975).

2.1.2. Menschliche Zellkulturen

Tint und Bierly (1969) verglichen die Virustiter von CV_1 und Calflymph-Vakzine (CLV) in menschlichen embryonalen Nierenzellen (HEK) und menschlichen Ammionzellen (HAC). Das Wachstum des attenuierten Stammes war besonders in HEK (Titer: $1o^{4,15}$ $KID_{5o/ml}$) gegenüber CLV (Titer: $1o^{8,28}$ $KID_{5o/ml}$) reduziert. Die Plaque-Durchmesser in HEP_2-Zellen (Zell-Linie aus menschlichen Papillomen) unterscheiden sich nach einer Messung von John (1969) beträchtlich von denen der Vergleichsstämme CL und LCA. 72 Std. post infectionem (p.inf.) maßen die CV_1-Plaques durchschnittlich 14 mm (bei 2o-facher Vergrößerung), diejenigen der Vergleichsstämme durchschnittlich 28 bzw. 33 mm.

V.d. Noordaa (1964) beobachtete bei seiner Ei-Vakzine (CV_2) einen geringeren Plaque-Durchmesser in menschlichen embryonalen Lungenzellen (HEL) und in U-Zellen (Mensch-

liche Uterus-), was für eine schwächere Virulenz spricht (siehe Tab. 1). Die Vermehrungsrate in U-Zellen war nach 24 Std. gegenüber den Vergleichsstämmen Elstree und Copenhagen deutlich reduziert: Elstree vervielfachte sich 2oo mal, Copenhagen 37o mal, $\underline{CV}_2$ dagegen nur 9o mal.

Stamm DIS ließ sich auf HeLa-Zellkulturen (Zell-Linie aus einem menschlichen Cervixkarzinom) nicht vermehren, während der Ausgangsstamm DIE einen typischen CPE zeigte (Tagaya et al., 1961). In HEK- und HEL-Zellen fand ein schwaches Wachstum statt; der CPE war nur wenig ausgeprägt. In beiden genannten Zellkulturen entwickelte sich das virulente DIE-Virus sehr stark (Tagaya et al., 1973).

Nach Mayr (1976) sind Primärkulturen aus menschlichen embryonalen Nieren-, menschlichen Amnion- und U-Zellen gegenüber MVA-Virus um den Faktor $> 1o^4$ weniger sensibel als gegen die Vergleichsstämme CVA und Elstree (WHO-Referenzstamm). Außerdem fehlt dem MVA-Virus die Fähigkeit, in Nierenzellen und U-Zellen Plaques zu bilden. MVA besitzt somit für menschliche Zellkulturen höchstens noch eine schwache Virulenz.

2.1.3. Sonstige Zellsysteme

John (1969) maß die Plaque-Durchmesser von $\underline{CV}_1$ in sekundären MK-Zellen (Affennieren-Zellen) im Vergleich zu den virulenten Stämmen CL und LCA. Letztere verursachten wesentlich größere Plaques (s. Tab. 1). Der Titer von $\underline{CV}_1$ in MK-Zellen betrug $1o^{7,34} KID_{5o}$.

DIS hinterläßt in primären und permanenten MK-Zellen, in Kaninchen-Nieren (RK)- und in Schweine-Nieren (ESK)-Zellen keinen CPE und vermehrt sich nur sehr schwach in primären MK-Zellen. Wachstum und CPE in Meerschweinchen-Nieren-Zellen waren ebenfalls gering (Tagaya et al., 1973).

MVA vermehrt sich in Schweine-Nieren, Kälber-Nieren- und Kälberhoden-Zellen nur abortiv (Mayr et al., 1975).

2.1.4. Interferonbildung

Kitamura (1963) stellte nach Infektionen von FHE-Zellen mit Stamm DIS höhere Interferontiter als nach Infektion mit DIE fest. Besonders hohe Titer fand er, wenn das attenuierte Virus durch ultraviolette Strahlung inaktiviert war.

Vergleichbare Ergebnisse erhielten Mayr et al. (1975): Nach UV-Inaktivierung gleicher Virusmengen konnten mit hohen Zellkulturpassagen von Vaccinia-Virus bessere Interferonpräparationen hergestellt werden als mit Virus der niedrigen Kulturpassagen.

2.2. Hühnerei-Marker

Die attenuierten Stämme führen im Vergleich zu den virulenten Stämmen allgemein zu schwächer ausgeprägten Primärherden auf der CAM.

Stamm CV_1 hinterläßt auf der CAM kleinere konvexe Herde von blaß-weißer Färbung mit weniger deutlichen Rändern als die virulenten Vergleichsstämme (CL, LCA). Umbilikation der Herde sieht man kaum. Erstaunlicherweise besitzt er bezüglich Embryonensterblichkeit die höchste Virulenz: Bei niedrigen Dosen, die gerade noch Pocken auf der beimpften CAM auftreten lassen, stellte John (1969) bereits eine 100%ige Absterberate fest.

Rivers Ei-Vaccine CV_2 bildet auf der CAM ebenfalls kleine Primärherde mit fehlender zentraler Nekrose und geringer Tendenz zur Proliferation. Die Absterbequote nach Beimpfung der CAM ist ebenfalls außerordentlich hoch: Eine Dosis von $10^{0,7}$ PFU/Ei (Pocken-bildende Einheiten) reicht aus, um 100 % der Embryonen innerhalb 3 Tagen abzutöten (v.d. Noordaa, 1964).

Die CAM stellt für DIS ein sehr empfängliches Wirtsystem dar. Tagaya (1973) ermittelte Titer von $10^{7,7}$ PFU/ml. Trotzdem sieht man nur winzige Pocken, ein Zeichen abgeschwächter Virulenz des attenuierten Stammes (Tagaya et al., 1961).

Verursacht Stamm CVA (Dermovaccine-Virus) große flache Herde mit breiter zentraler Nekrose, so hinterläßt das modifizierte Vaccine-Virus Ankara nur noch kleine, kompakte Proliferationsknötchen ohne zentrale Nekrose (Mayr et al., 1975). Entsprechend beträgt die Absterberate von

Hühner-Embryonen (Virusdosis in o,1 ml : $1o^{2,o}$ KID_{5o}) nur 4o %. Der virulente Vergleichsstamm CVA verursacht 1oo % Mortalität (Mayr et al., 1975).

2.3. Versuchstier-Marker (Maus)

2.3.1. Neurovirulenz

Für die neugeborene Maus besitzt CV$_1$ eine außerordentlich starke Neurovirulenz. Bei einer Dosis von 1oo PFU (o,o5 ml) starben alle intracerebral (i.cer.) infizierten Babymäuse innerhalb 4 Tagen. Der virulente Stamm CL erreichte vergleichsweise eine nur 9o%ige Mortalität innerhalb 8 Tagen (John, 1969).

Intracerebral mit DIS infizierte infantile und adulte Tiere zeigten nach dem Eingriff keinerlei klinischen Symptome (keine Dosisangaben) (Tagaya et al., 1961).

Fehlende Neurovirulenz zeichnet auch den Stamm MVA aus: Nach intracerebraler Applikation von o,o5 ml bzw. o,1 ml (Virustiter: $1o^{6,o}$ FHE $KID_{5o/ml}$) traten bei infantilen und adulten Mäusen keine Todesfälle auf, während in der gleichen Weise mit CVA-Ausgangsvirus i. cer. infizierte Tiere zu 1oo % starben (Mayr et al., 1975).

2.3.2. Virulenz bei parenteraler Applikation

Eine intraperitoneale Inokulation abgestufter Dosen ($1o^6$ bis $1o^2$ KID_{50}) führte bei MVA-infizierten Mäusegruppen zu sehr wenigen Todesfällen (von 145 Tieren starben 14), während das in gleicher Weise anderen Mäusegruppen verabreichte CVA-Ausgangsvirus eine hohe Mortalität verursachte (von 145 Tieren überlebten 23) (Hochstein-Mintzel et al., 1972).

2.4. Versuchstier-Marker (Kaninchen)

2.4.1. Hautvirulenz

Stamm DIS hinterließ bei intradermaler Injektion eines hochtitrigen Inokulums eine wenige Tage anhaltende, lokale, flache Schwellung und leichte Rötung; die mittels Skarifikation infizierten Kaninchen blieben ohne lokale Veränderungen (Tagaya et al., 1961).

Die Hautvirulenz des MVA-Virus läßt sich gut an der Primärreaktion nach der Impfung studieren: Intrakutane (o,1 ml) und kutane (Skarifikation o,o5 ml) Applikationen führten zu keiner Primärreaktion an der Impfstelle (Bezugswert $1o^{6,o}$ FHE $KID_{5o/ml}$).
Generalisationen traten nicht auf. Tiere, die in gleicher Weise das virulente CVA-Virus verabreicht bekamen, zeigten bei beiden Applikationen eine sehr starke Primärreaktion (Mayr et al., 1975).

2.4.2. Virulenz bei parenteraler Applikation

Bei intravenöser Applikation von MVA-Virus (1,o ml Titer $1o^{6,o}$ FHE $KID_{5o/ml}$), fehlten Anzeichen einer Generalisierung völlig (Mayr et al., 1975). Das Verhalten von MVA-Virus im Organismus bei i.v. Injektion wurde auch von Hochstein-Mintzel et al. (1972) untersucht: Eine Dosis von $2,o \cdot 1o^6$ KID_{5o}/Tier (1,o ml) führte bei einem von 2 infizierten Kaninchen zur Ausbildung einer einzigen Pustel, während die mit Stamm Elstree i.v. infizierten Tiere bereits bei einer 1o-fach geringeren Viruskonzen-

tration eine sehr starke Generalisierung zeigten (Pusteln waren nicht mehr zählbar).
Intramuskuläre Injektionen mit abgestuften Dosen von MVA-Virus (Titer: 10^4 bis 10^8 PFU, 1,0 ml) bewirkten keine lokalen Läsionen oder klinischen Symptome, während Vergleichsstamm Elstree bei der gleichen Applikationsweise immerhin bei beiden mit 10^8 PFU immunisierten Kaninchen eine passagere lokale Schwellung verursachte (Hochstein-Mintzel et al., 1972).

2.5. Versuchstier-Marker Huhn

Hautvirulenz: Tagaya (1961) infizierte frisch ausgeschlüpfte Küken subkutan mit DIS. Keines der Tiere zeigte klinische Symptome.

Mayr et al. (1975) untersuchten bei Küken und Junghühnern die Lokalreaktion nach kutaner MVA-Follikelimpfung: Bei Küken war nach Verabreichung von $10^{4,7}$ KID_{50} in 0,05 ml keine Primärreaktion sichtbar. Junghühner zeigten eine schwache Primärreaktion. Vergleichsstamm CVA, im gleichen Impfmodus verabreicht, hinterließ bei Küken und Junghühnern jeweils eine wesentlich stärkere Hautveränderung an der Impfstelle.

2.6. Versuchstier-Marker (Affe)

2.6.1. Neurovirulenz

Morita et al. (1977) stellten vergleichende Untersuchungen an Cynomolgus-Affen an, in deren Verlauf die Tiere mit verschiedenen Vacciniastämmen intracerebral infiziert wurden. Stamm CV$_1$ zog die höchste Todesrate nach sich: Abgestufte Dosen von 2 • $1o^6$ bis 2 • $1o^8$ PFU in o,5 ml, verabreicht an 3 Gruppen mit je 3 Tieren, führten zu einer 1oo%igen Mortalität. Von den Affen, die unter den gleichen Bedingungen mit Stamm Elstree infiziert worden waren, überlebte keiner die Dosis von 2 • $1o^8$ PFU, aber ein Großteil die Dosis von 2 • $1o^6$ PFU.

Dagegen sah man keine Todesfälle bei den Tiergruppen, die in der gleichen Weise Stamm DIS als Inokulum erhalten hatten. Tagaya et al. (1973) infizierten 2 Cynomolgusaffen mit hohen DIS-Virusdosen ($1o^{8,o}$ $KID_{5o/ml}$): Das eine Tier erhielt eine intrathalamische Applikation (o,4 ml), dem anderen wurden o,o25 ml intracisternal verabreicht. Beide zeigten am 3. - 6. Tag p. inf. einen Anstieg der Körpertemperatur gefolgt von Mattigkeit und Anorexie. Diese Symptome blieben bei dem intracisternal beimpften Tier bis zum 1o. Tag p. inf. bestehen.

Keine Neurovirulenz ließ sich für Stamm MVA an intrathalamisch infizierten Makakus irus - Affen nachweisen. (Titer: $1o^{6,o}$ FHE $KID_{5o/ml}$; Dosis: o,1 ml). Die Morbidität betrug O %, während die mit dem virulenten CVA-Stamm und anderen Vaccinia-Viren, selbst mit dem Stamm Elstree infizierte Affen zu 1oo % erkrankten (Mayr et al., 1975).

2.6.2. Hautvirulenz

Die Applikation mittels Multiple Pressure-Methode (M.P.), die intradermale Injektion sowie die Skarifikation mit Stamm DIS zogen bei 2 Cynomolgusaffen mildere Hautreaktionen nach sich als das virulente DIE-Virus. Nach M.P. trat ein Rötungsbezirk von 1o mm Durchmesser mit einer Pustel auf (Titer: $7{,}5 \cdot 1o^5$ PFU; o,o5 ml). Stamm DIE verursachte einen größeren Rötungsbezirk von 15 mm Durchmesser mit einer Pustel. Auch nach intradermaler und kutaner Applikation von DIS (Titer: $3 \cdot 1o^5$ PFU) (keine Dosisangaben) ließen sich weniger heftige lokale Hautreaktionen als nach DIE-Applikation feststellen (Kitamura et al., 1967). Tagaya et al. (1973) infizierten 2 Cynomolgus-Affen mittels M.P.-Verfahren mit DIS-Virus (Titer: $1o^{8,o}$ $KID_{5o/ml}$) und beobachteten dann am 6. Tag p. inf. eine schmale lokale Rötungszone.

Intrakutan (o,2 ml), kutan (o,o5 ml) und buccal (o,1 ml) mit MVA infizierte Affen (Titer: $1o^{6,o}$ FHE $KID_{5o/ml}$) ließen keine Primärreaktionen an der Impfstelle erkennen (Mayr et al., 1975).

2.6.3. Virulenz bei parenteraler Applikation

Intravenöse Applikationen von DIS-Virus (1,o ml, Titer: $1o^8$ $KID_{5o/ml}$) blieben bei 2 Cynomolgus-Affen ohne erkennbare klinische Folgen.
Zwei intramuskulär immunisierte Affen (1,o ml, Titer $1o^{7,7}$ PFU) zeigten lokal leichtere Indurationen und Schwellungen (Tagaya et al., 1973).

Intramuskulär mit MVA infizierte Affen (1,o ml, Titer: $5 \cdot 1o^5$ bis $1o^8$ PFU) hatten in der Folge geringfügige und nur histologisch nachweisbare entzündliche Reaktionen an der Impfstelle; allgemeine Krankheitserscheinungen wurden nicht beobachtet (Hochstein-Mintzel et al., 1975).

2.7. Eigenschaften der attenuierten Pockenimpfstämme bei der Anwendung am Menschen

Stamm $\underline{CV}_1$ unterscheidet sich bezüglich der Primärreaktion an der Impfstelle nicht wesentlich von einer virulenten Standardvakzine, wenn das Multiple Pressure-Verfahren eingesetzt wird: Nach Kempe (1968) waren bei Ekzem-Patienten lediglich die lokale Rötung und Schwellung etwas weniger stark ausgeprägt (Dosis variabel). Die subkutane Impfung hinterließ keinerlei lokale Hautläsion (Dosis: $10^{5,4}$ und $10^{6,4}$ KID_{50}, 0,3 ml oder 0,1 ml). Der Prozentsatz der Patienten mit postvakzinalen klinischen Symptomen war deutlich geringer als nach Impfung mit herkömmlichen Vakzinen. Anhand der Häufigkeit des Auftretens von Fieberfällen nach der Impfung läßt sich die schwächere Virulenz des attenuierten Stammes demonstrieren: Von 175 Ekzem-Patienten, die ihre Primovakzination mit Stamm $\underline{CV}_1$-78 erhielten, zeigten 90 % kein Fieber, dagegen trat in der Vergleichsgruppe der mit Standard-Vakzine (Dryvax) geimpften normalen Kinder lediglich bei 60 % von 36 Erstimpflingen kein Fieber auf (Kempe, 1968). Nach Cherry et al. (1977) war Stamm $\underline{CV}_1$ bei der perkutanen Erstimpfung von 1585 Kindern 10-fach weniger infektiös als die Standardvakzinen (New York City Calf Lymph, New York City Chorioallantoic und Stamm Elstree): Während die genannten Standardvakzinen die menschliche ID_{50} bereits bei einem Titer von 10^6 PFU/ml erreichten, benötigten die Autoren vom Stamme CV_1 10^7 PFU/ml, um bei der Hälfte der Erstimpflinge ein "Angehen" der Impfung zu bewirken. Außerdem traten geringere Hautveränderungen nach der perkutanen Primovakzination auf: "Central lesion" und Erythem waren schwächer ausgeprägt. Die Anzahl der Fiebertage, die innerhalb von 4 - 14 Tagen p. inf. ermittelt wurde, verringerte sich gegenüber den lizensierten Stämmen deutlich. Bei subkutaner Immunisierung mit Stamm $\underline{CV}_1$

(10^6 - 10^8 PFU) kam es im allgemeinen zu keiner signifikanten Erhöhung der Körpertemperatur. 12 % der Erstimpflinge zeigten ein postvakzinales Erythem (gegenüber 34 % bei Stamm Elstree) (Connor et al., 1977).

Die Hautreaktion nach Primovakzination mit Stamm $\underline{CV}_2$ (Multiple Pressure- oder Scratch-Methode) ist derjenigen ähnlich, die nach Impfung mit dem virulenten Calf Lymph-Stamm beobachtet wird. Der Ablauf der verschiedenen Stadien (macula, papula, vesicula, pustula und crusta) erfolgt in der üblichen Zeitspanne. Die Impfpocke zeigt aber in der Regel eine geringere Tendenz zur Nekrose, und Schwellung sowie Rötung in der Umgebung der Impfstelle sind im allgemeinen beträchtlich schwächer ausgeprägt. Die Erstimpflinge leiden nach $\underline{CV}_2$-Vakzination, verglichen mit der Calf Lymph-Impfung, wesentlich weniger an Symptomen wie Hals-, Nacken- oder Kopfschmerzen (v. d. Noordaa, 1964). Durch Messungen der Körpertemperatur vom 2. bis 12. Tag nach der Impfung wurden in der Gruppe der 1012 mit Elstree geimpften Personen insgesamt 109 Fiebertage innerhalb der Beobachtungszeit ermittelt (Werte über 38° C). In der mit Rivers Eivakzine ($\underline{CV}_2$) geimpften Gruppe (1089 Personen) betrug die Zahl der Fiebertage nur 45 (v. d. Noordaa et al., 1967).

Stamm MVA zeichnet sich beim Menschen gegenüber konventionellen Vaccinia-Stämmen durch eine stark verminderte Hautvirulenz aus. Die Reaktion an der Impfstelle besteht 24 bis 48 Std. nach der intrakutanen Applikation in einem annähernd kreisrunden Rötungsbezirk mit oder ohne geringfügige Infiltration von 10 bis 20 mm Durchmesser. Die intramuskuläre Impfung, die kutane Schnittimpfung sowie die subkutane Impfung lassen keine lokale Primärreaktion erkennen (Dosis: 0,2 ml, 10^6 FHE $KID_{50/ml}$) (Stickl et al., 1974; Mayr et al., 1975). Die allgemeine Reaktion nach

MVA-Impfung prüften Stickl et al. (1974) an insgesamt 7o98 Erstimpflingen. Eine Störung des Allgemeinbefindens trat nur bei 4,11 % der Kinder auf; Fieber über 38 °C zeigten 2,28 %.

2.8. Serologische Eigenschaften der attenuierten Pocken-Impfstämme

Verglichen mit virulenten Pockenimpfstämmen neigen attenuierte Pockenstämme dazu, eine schwächere humorale Immunreaktion (Antikörperbildung) im Organismus hervorzurufen.

Nur 3o % von 223 mit Stamm $\underline{CV}_1$ perkutan vakzinierten Erstimpflingen, die auch eine Erstimpfreaktion aufwiesen, entwickelten neutralisierende Antikörper in signifikanter Höhe. Dagegen reagierten 82 bis 85 % der mit New York City Calf Lymph (NYC-CL), mit NYC Chorioallantoic Membran (NYC-CAM) und mit Stamm Elstree vakzinierten Kinder im Neutralisationstest positiv (Cherry et al., 1977). Stamm $\underline{CV}_1$ induzierte auch nach subkutaner Primovakzination bei Kindern im Vergleich zu den genannten virulenten Stämmen in geringerem Maße eine Antikörperreaktion: 14 % von 253 Erstimpflingen entwickelten neutralisierende, 74 % bildeten hämagglutinationshemmende (HAH) Antikörper. Von den Kindern, die mit den NYC-Stämmen und mit Stamm Elstree primovakziniert waren, reagierte ein höherer Prozentsatz (25 % bzw. 85 % bei St. NYC-CAM) eindeutig positiv (Connor et al., 1977).

In einem Versuch, den v.d. Noordaa (1964) an 2 Gruppen von je 4o Soldaten durchführte, wurde die unterschiedliche humorale Immunität, welche der attenuierte und der virulente Pockenstamm induzieren, deutlich: Die erste, mit Rivers Eivakzine ($\underline{CV}_2$) primovakzinierte Gruppe zeigte ein Jahr nach der Impfung im Durchschnitt Neutralisationstiter von 1 : 16, während die mit Calf Lymph, Stamm Copenhagen, immunisierte Gruppe nach einem Jahr durchschnittlich einen Neutralisations-Antikörpertiter von 1 : 64 aufwies.

Tagaya et al. (1961) hoben die Fähigkeit von Stamm DIS (CAM-Material) hervor, gute HAH-Antikörper zu induzieren. Versuche von Kitamura (1967) an 2 Cynomolgus-Affen geben die Antikörper-Reaktion nach gleichzeitig erfolgter mehrfacher dermaler Applikation von Stamm DIS wider: Beide Tiere zeigten eine HAH-Antikörperreaktion, die nur unwesentlich von der des virulenten Elternstammes abwich. Neutralisierende Antikörper waren ebenfalls fast in gleicher Höhe wie nach Verabreichung des virulenten Stammes DIE nachweisbar. Tagaya et al. (1973) immunisierten 3 Gruppen von Cynomolgus-Affen bei Anwendung unterschiedlicher Applikationsmethoden mit Einzeldosen. Dabei waren nach subkutaner ($10^{7,7}$ PFU, 1,0 ml), intradermaler ($10^{7,0}$ PFU; 0,2 ml) und intramuskulärer ($10^{7,7}$ PFU; 1,0 ml) Inokulation des attenuierten Stammes DIS innerhalb 13 Wochen p. inf. keine neutralisierenden Antikörper nachweisbar. 2 Wochen p. inf. traten aber HAH-Antikörper auf, die eine Woche später die höchsten Titer erreichten und dann allmählich absanken (keine Titerangaben).

Wiederholt subkutan und intradermal mit DIS (CAM-Material) infizierte Kaninchen reagierten serologisch mit einer nur schwachen Immunantwort. Die Antikörperbildung 6 Wochen nach der letzten Inokulation war bedeutungslos. Nur bei subkutaner Applikation zusammen mit Freund'schem Adjuvans ließen sich Antikörpertiter ermitteln (Kitamura et al., 1967).

Einmalige intramuskuläre Applikationen von Stamm MVA (Dosis 10^4 - 10^8 PFU in 1 ml) bei 11 Kaninchen bewirkten - von einer Ausnahme abgesehen - keine Bildung von HAH-Antikörpern. Erst die Zweitimmunisierung mit MVA in der gleichen Dosierung 14 Tage später induzierte bei 4 Tieren mäßige Titer (Hochstein-Mintzel et al., 1975).

Andere Ergebnisse lieferte eine Untersuchung, in deren Verlauf Kaninchen mit MVA intravenös infiziert wurden: Bei 8 von 11 immunisierten Tieren ließen sich signifikante Titer an HAH-Antikörpern feststellen (Titerwerte von 1 : 64 bis 1 : 128) (Hochstein-Mintzel et al., 1972). 14 Tage nach der intramuskulären Erstimmunisierung von 8 Affen (Macaca mulatta) mit abgestuften Dosen von Stamm MVA ($5 \cdot 10^5$ bis $5 \cdot 10^8$ PFU; 1 ml) waren bei keinem Tier HAH-Antikörper zu ermitteln, nur 3 Tiere reagierten schwach positiv im Neutralisationstest. 2 Wochen nach der Zweitimmunisierung, die 2o Tage nach der Erstimmunisierung folgte, reagierte immerhin die Hälfte der Tiere in der HAH positiv. Im Neutralisationstest hatten 7 von 8 Affen Antikörper-Titer.

In erwachsenen weißen Mäusen vermochten Hochstein-Mintzel et al. (1972) weder durch einmalige Immunisierung (10^3 - 10^7 Viruseinheiten/Tier; o,5 ml), noch durch wiederholte subkutane Infektionen von Stamm MVA (10^1 - 10^5 Viruseinheiten/Tier; o,5 ml) HAH-Antikörper zu induzieren.

2.9. DNS-Marker und Molekulargewicht des attenuierten Pockenstammes MVA

Vergleichende Strukturuntersuchungen am Virusgenom von Impfstamm Elstree und Stamm MVA bzw. verschieden hoher Passagen des CVA-Virus wurden zur Klärung der Frage nach der genetischen Fixierung und damit Stabilität der veränderten biologischen Eigenschaften des modifizierten Vaccinia-Virus Ankara durchgeführt. Ein anderes Orthopockenvirus, Kaninchenpockenvirus, Stamm Utrecht, lief parallel. Dabei galt es, Abweichungen in der DNS-Sequenz des MVA-Virus gegenüber seinem Ausgangsstamm CVA bzw. anderen Orthopocken-Virusstämmen nachzuweisen.

Man bedient sich zum Zweck der Aufschlüsselung der genetischen Struktur eines Virus bakterieller Enzyme (Restriktionsendonukleasen), die bestimmte DNS-Fragmente aus dem Virusgenom herausspalten. Diese Bruchstücke können dann gelelektrophoretisch aufgetrennt und analysiert werden (Bickle et al., 1977; Gangemi und Sharp, 1976; Joklik, 1962; Müller und Schaffner, 1977; Müller et al., 1978; Wittek et al., 1977).
In der elektrophoretischen Auftrennung sieht man, daß sich die genetische Struktur des MVA-Virus von derjenigen des CVA-Ausgangsstammes und des Elstree-Stammes ebenso wie von der des Kaninchenpockenvirus stark unterscheidet; Die 5oo. und 572. Pass. des CVA-Virus, letztere entspricht dem MVA-Virus , lassen kaum noch weitergehende Veränderungen in den Elektrophorese-Banden erkennen. Die genetische Struktur von MVA ist also stabil geworden und sowohl vom Ausgangsvirus als auch vom Referenzstamm Elstree deutlich verschieden.

Das Genom von CVA-1 (1. Passage) verkürzte sich während der Attenuierung zum MVA - 572 (572. Passage des CVA-Virus) um ca. 9 %. Das Molekulargewicht sank von 2o · $1o^6$ Daltons (CVA) auf 16 · $1o^6$ Daltons (MVA) (Mayr et al., im Druck, 1979).

	MVA	CV_1	CV_2	DIS	virulenter Vergleichsstamm
Hühnerembryofibroblasten (FHE)	V.: ++++ L.: ++++ Titer: > 10^8 KID_{50}/ml gute Plaquebild. CPE: kleine Abkugelung mit granulärem Zerfall	V.: ++++ L.: ++++ Titer: $10^{6,8}$ KID_{50}/ml +) Plaquedurchmesser in mm. 48 Std.p.inf.:33 (vgl. LCA : 21)	V.: +++ L.: +++ Titer: 10^6 IU/ml Plaquebildung	V.: ++++ Titer: $10^{8,2}$ KID_{50}/ml Ausbildung typischer Plaques CPE: mild	CVA: V.: ++++ L.: ++++ Titer: 10^{8} > KID_{50}/ml Plaquebildung stark ausgeprägt CPE: schollige Degeneration mit Zellverschmelzung
Kulturen aus menschlichen Zellen	V.: abortiv L.: - Titer in KID_{50}/ml HEK.: $10^{3,5}$ HAC.: $10^{4,0}$ U. : $10^{2,25}$	V.: abortiv in HAC u. U. +) Plaquedurchmesser HEP_2 in mm. 72 Std.p.inf.:14 (vgl. LCA :33) Titer in KID_{50}/ml HEK.: $10^{4,15}$ HAC.: $10^{6,95}$	Vermehrungsrate in U.-Zellen 24 Std.p.inf.: 90° (vgl. Elstree:200°) +) Plaquedurchmesser U.-Zellen in mm. 4 Tage p.inf.: 8,7 (vgl. Elstree : 11,2)	V.: HEK.: + HEL.: ∓ HeLa: -	Elstree: V.: ++++ L.: ++++ Titer in KID_{50}/ml HEK.: $10^{8,75}$ HAC.: $10^{9,75}$ U. : $10^{7,5}$
sonstige Zellkulturen	V.: L.: kk. ∓ - kt. ∓ - pk. ++ (plaque)	+) Plaquedurchmesser sekundäre MK in mm. 72 Std.p.inf.:39 (vgl. LCA :55 Titer in KID_{50}/ml MK.: $10^{7,34}$	nicht untersucht	V.: prim. MK.: ∓ sek. MK.: - RK.: - ESK.: - GPK.: +	CVA: V.: L.: kk.: ++++ ++++ kt.: ++++ ++++ pk.: ++++ ++++ V.: Dairen-I(DIE) MK.,RK.,GPK.,ESK.: ++++

Tabelle 1: Zellkultur - Marker

+) = gemessen bei 20 facher Vergrößerung

V.= Vermehrung/+= positiv
L.= Lysis /-= negativ
Zellkulturen:
HEK: menschl. embryon.Nieren
HAC: " " " " Amnionzellen
U. : " " " " Uteruszellen

HEP2:menschl.embryon.Papillome
HEL:menschl.embryon.Lungen
kk : Kälbernierenzellen
kt : Kälberhodenzellen
pk : Schweinenierenzellen
MK : Affennieren
RK : Kaninchennieren

MVA	CV_1	CV_2	DIS	vir.Vergleichsstamm
kleine kompakte Proliferationsknötchen ohne zentrale Nekrose	kleinere Herde konvex, blaß weiß mit wenig deutlichen Rändern. Selten Nabelbildung	kleinere Herde keine zentrale Nekrose.	"tiny"pocks" (winzige Pokken) Titer: $10^{7,7}$ po.f.units/ml	CVA: große Herde, flache Oberfläche, Farbe trüb weiß, scharfe Ränder, zentrale Nekrose stark ausgeprägt.
Absterbequote nach Beimpfung der CAM: 40 % Dosis: 10^3 $FHE\text{-}KID_{50/ml}$, 0,1ml	Absterbequote nach Beimpfung der CAM: 100 % Dosis: bereits bei wenigen po.f. units.	Absterbequote nach Beimpfung der CAM: 100 % Dosis: $10^{0,7}$ Pfu/Ei	nicht untersucht	CVA: Absterbequote nach Beimpfung der CAM: 100 % Dosis: s. MVA

Tabelle 2: Hühnerei - Marker

CAM = Chorioallantoismembran
po.f.units: pock forming units
Pfu : plaque forming units

MVA	CV_1	CV_2	DIS	vir. Vergleichsstamm	
Todesfälle: infant. i.cer. 0 % Dosis: $10^{6,0}$ FHE-KID_{50}/ml 0,05 bzw. 0,1 ml	Todesfälle: infant. i.cer. 100 % (innerhalb 4 Tagen) Dosis: 100 Pfu, o,o5ml	nicht untersucht	Todesfälle: infant. i. cer. 0 %, keine klinischen Symptome. adult. i.cer. 0 %, keine klin. Sympt.	CVA: Todesfälle: infant. i.cer. 100 % adult. i.cer. 100 % Dosis: s. MVA	Neurovirulenz, Maus
Überlebensrate: infant.i.p. 131/145 Dosis: abgestuft von 10^6 - 10^2 KID_{50}	nicht untersucht	nicht untersucht	nicht untersucht	CVA: Überlebensrate: infant.i.p. 23/145 Dosis: abgestuft von 10^6 - 10^2 KID_{50}	Maus-Virulenz bei parenteraler Applikation
Primärreaktion an der Impfstelle: Küken : keine Huhn : + Dosis: (kutane Follikelimpfung) $10^{4,7}$ FHE KID_{50}ml 0,05 ml	nicht untersucht	nicht untersucht	Klinische Symptome: Küken subkutan: 0 %	CVA: Primärreaktion an der Impfstelle: Küken: +++ Huhn : +++ Dosis: (kutane Follikelimpfung) s. MVA	Hautvirulenz, Huhn

Tabelle 3: Maus - Marker, Huhn - Marker + = positiv Pfu = plaque forming units

MVA	DIS	vir. Vergleichsstamm	Bemerkungen	
Primärreaktion an der Impfstelle: keine P. sichtbar Dosis: 10^6 FHE KID_{50}/ml ik.: 0,1ml; k.: 0,05ml	Primärreaktion an der Impfstelle: ik.: (hochtitriges Inokulum) wenige Tage lang leichte Rötung und flache Schwellung. k.: (hochtitr. Inokul.) keine Läsionen auf der Haut erkennbar.	CVA: Primärreaktion an der Impfstelle: ik.: ++++ k. : ++++ Dosis: s. MVA	CV_1 u. CV_2 nicht untersucht	Hautvirulenz
Haut- und Schleimhautaffektionen (KID_{50} / Tier) i.v.: $5{,}6.10^7$: zahlreiche Pusteln und Ulcera $2{,}2.10^7$: wenige Pusteln, Ulcus ∓ $2{,}2.10^6$: keine Generalisation Lokale Läsionen oder oder klinische Symptome i.m.: keine Dosis: abgestufte Dosen von 10^8 - 10^4 Pfu, 1,0ml	nicht untersucht	Elstree: Haut- und Schleimhautaffektionen (KID_{50} / Tier) i.v.: $2{,}0\cdot10^5$: unzählige Pusteln u. Ulcera $2{,}0\cdot10^4$: zahlreiche Pusteln u. Ulcera $2{,}0\cdot10^3$: Generalis.: ∓ Elstree: Lokale Läsionen oder klinische Symptome i.m.: pass agere lokale Schwellung zweier mit 10^8 KID_{50} infizierter Tiere Dosis s. MVA	CV_1 u. CV_2 nicht untersucht	Virulenz bei parenteraler Applikation

Tabelle 4: Kaninchen - Marker ik. = intrakutan k. = kutan im. = intramuskulär i.v. = intravenös + = positiv ∓ = fraglich

MVA	CV_1	DIS	vir. Vergleichstamm	Bemerkungen	
Primärreaktion an der Impfstelle: Macacus irus keine P. sichtbar Dosis: 10^6 FHE KID_{50}/ml ik.: 0,2ml, k.: 0,05ml b.: 0,1ml	nicht untersucht	Primärreaktion an der Impfstelle: Cynomolgus Affen milde P. sichtbar M.P.: Dosis 7,5 $\cdot 10^5$ Pfu, 0,05 ml k.: $3 \cdot 10^5$ Pfu	CVA: Primärreaktion an der Impfstelle: Macacus irus ik.: ++++ k.: ++++ b.: ++++ Dosis s. MVA	CV_2 nicht untersucht	Hautvirulenz
Veränderungen an der Impfstelle, klin. Symptome: i.m. Appl.:geringfügig nur histol. nachweisbare lok.entzündl.Veränderungen an der Impfstelle, keine klin.Sympt. Dosis: $5 \cdot 10^5$-10^8 Pfu 1,0ml	nicht untersucht	Veränderungen an der Impfstelle: i.m.Appl. Am 4., 7. und 9. Tag p.inf.: leichte Induration und Schwellung Dosis: $10^{7,7}$ Pfu 1,0ml	Vaccinia-Stämme: nicht untersucht	CV_2 nicht untersucht	Virulenz bei parenteraler Applikation
Klinische Symptome intrathalamische Injektion: 0 % Dosis: 10^5 FHE KID_{50} 0,1ml	Überlebensrate: intrathalamische Injektion: 0 % Dosis: abgestuft von $2 \cdot 10^8$ - 10^6 Pfu/ml 0,5ml LD_{50}: $6,3 \cdot 10^5$ Pfu	Überlebensrate: intrathalamische Injektion: 100 % Dosis s. CV_1 LD_{50}: $6,3 \cdot 10^8$ Pfu	Elstree: Überlebensrate: intrathalamische Injektion: 28 % Dosis s. CV_1 LD_{50} : $4,4 \cdot 10^6$ Pfu	CV_2 nicht untersucht	Neurovirulenz

Tabelle 5: Affen - Marker

ik. = intrakutan k. = kutan b. = buccal Pfu = plaque forming units
M.P. = multiple pressure
+ = positiv

MVA	CV_1	CV_2	vir. Vergleichstamm	Bemerkungen
Primärreaktion an der Impfstelle: ik.: wenig Rötung, schwache Infiltration bis 20mm. k. : keine P. sichtbar im.: nur histologisch nachweisbare Reaktion sc.: keine Lokalreaktion sichtbar Dosis: 10^6 FHE KID_{50}/ml 0,2ml bei ik.u.im.	Primärreaktion an der Impfstelle: M.P.: etwas schwächere Rötung und Schwellung als Standardvaccine (Dryvax) sc.: keinerlei lokale Hautläsion Dosis: $10^{5,4}$ und $10^{6,4}$ $TCID_{50}$/ml, 0,3ml u. 0,1ml	Primärreaktion an der Impfstelle: M.P. oder scratch-Methode: Bildung einer Impfpocke in der üblichen Zeit, meist weniger nekrotisch, Rötung und Schwellung weniger stark als vir. calf lymph-Stamm. Dosis: 10^8 Pfu/ml	CVA: Primärreaktion an der Impfstelle: ik.: starke Reaktion mit Pustelbildung und Nekrosen k. : starke Erstimpfreaktion Dosis: 10^6 FHE KID_{50}/ml bei ik. 0,2ml	DIS nicht untersucht
Klinische Symptome nach der Impfung: (7098 Erstimpflinge) 4,11 % zeigten eine Störung des Allgemeinbefindens, 2,28 % hatten Fieber über 38°C.	Klinische Symptome nach der Impfung: (175 Ekzempatienten) 10 % zeigten eine Fieberreaktion.	Klinische Symptome nach der Impfung: (1089 Erstimpflinge) insgesamt 45 Fiebertage wurden ermittelt. (vgl. St. Elstree: 109 Fiebertage bei 1012 Personen)	Elstree: Klinische Symptome nach der Impfung: (786 Erstimpflinge) 53 % hatten innerhalb 4 - 14 Tagen nach einer perkutanen Vakzination eine Fieberreaktion.	DIS nicht untersucht

Tabelle 6: Verhalten der attenuierten Stämme im Menschen.

ik.= intrakktan M.P. = multiple pressure
k.= kutan
im.= intramuskulär sc. = subkutan

3. Eigene Untersuchungen

3.1. Material und Methoden

3.1.1. Zellkulturen

Primäre Hühnerembryo-Fibroblasten (FHE) wurden aus 1o - 11 Tage vorbebrüteten Hühnerembryonen nach dem üblichen Verfahren (Mayr u. Kalcher, 196o) gewonnen und in Zellkultur-Glasröhrchen eingesät. Das Anzuchtmedium bestand aus 79 % Earle'scher Salzlösung, 1o % fetalem Kälberserum, 1o % Laktalbumin (hydrolisiert, 5%ige Lösung), 1 % Phenolrot in o,1%iger Lösung sowie 1oo I.E. Penicillin und 1oo µg Streptomycin/ml.
Als Erhaltungsmedium diente reine Rinderamnion-Flüssigkeit (RAF) mit Zusatz von 1 % Phenolrot und Antibiotika in der genannten Dosierung.

Die RK 13-Zell-Linie (Kaninchennierenzellen) wuchs in Glasflaschen und vermehrte sich bei wöchentlicher Teilung.

Zur Anzucht und Erhaltung diente Medium 199 mit 1o % Kälberserum und Antibiotika-Zusatz in der üblichen Menge.

3.1.2. Hühnereier

Verwendung fanden 1o - 11 Tage vorbebrütete Eier, deren Chorioallantoismembranen (CAM) nach der bei McCarthy und Dumbell (1961) beschriebenen Methode zur Aufnahme des Inokulums gesenkt waren.

3.1.3. Versuchstiere

Weibliche adulte NMRI - Mäuse mit einem Durchschnittsgewicht von 25 g zu Versuchsbeginn wurden in Makrolon-Käfigen gruppenweise gehalten. Die Fütterung erfolgte mittels Pellets (Altromin), die Tränke bestand aus Leitungswasser, das in Tropfflaschen abgefüllt war. Futter und Wasser bekamen die Tiere ad libitum.

3.1.4. Virusmaterial

1.) Impfstamm Elstree (2. FHE-Passage, lyophilisiert). Titer auf FHE: $10^{6,50}$ $KID_{50/ml}$.

Für den Neutralisationstest wurde der Impfstamm Elstree über 14 Passagen an RK_{13}-Zellen adaptiert und wies in diesem System einen Titer von $10^{6,25}$ $KID_{50/ml}$ auf.

2.) Impfstamm MVA (modifiziertes Vaccinia-Virus, Stamm Ankara, (Mayr et al., 1975), lyophilisiert). Titer auf FHE: $10^{7,5}$ $KID_{50/ml}$.

3.) Neurovirulenter Stamm M_1 (lyophilisiertes Zellkulturmaterial (FHE)) Titer auf FHE: $10^{6,5}$ $KID_{50/ml}$.

4.) Stamm "Bern" (tiefgefrorenes CAM-Material)
Titer variierend.

Das Virusmaterial war zur Lagerung bei - 2o° eingefroren.

3.1.5. Immunsuppression

Eine Ganzkörperbestrahlung mit der subletalen Dosis von 4oo R bewirkte eine Unterdrückung des Immunsystems der Versuchstiere.[1] Dazu diente eine Röntgenapparatur Typ MG 3oo der Fa. CH. F. Müller, Hamburg. Die Tiere wurden bei einer Dosisleistung von 7o R/min. solange der Bestrahlung ausgesetzt, bis 4oo R erreicht waren. Diese Bestrahlung führt nach eingehender Untersuchung von Messerschmidt und Schick (persönliche Mitteilung) zu einer signifikanten und anhaltenden Erniedrigung der Leukozytenwerte und damit zu einer Immunsuppression. Folgende technische Daten sind von Interesse: Filter o,77 mm Cu, Eigenfilterung der Röhre 6 mm Al, Focus-Tierabstand 4o cm, Röhrenspannung 25o KV bei 12 mA, Halbwertdicke 2,5 mm Cu, Duplex Dosimeter.

---

[1]: Für die Durchführung der Bestrahlungen bin ich Herrn Prof.Dr.O.Messerschmidt (Laboratorium für Experimentelle Radiologie, München) und seinen Mitarbeitern zu herzlichem Dank verpflichtet.

3.1.6. Serologische Methoden (Antikörpernachweis)

Hämagglutinationshemmungstest (HAH-Test)

Erythrozyten ließen sich durch zweimaliges Waschen mit physiologischer Kochsalzlösung aus Citratblut ausgewählter weißer Leghornhühner gewinnen.

Herstellung des Antigens: Vaccinia-Virus, Stamm Bern, wurde in einer geeigneten Verdünnung auf Chorioallantoismembranen von Hühnereiern gebracht. Am 4. Tag p. inf. sah man gut voneinander abgesetzte Pockenherde, die nach folgender Behandlung als Antigen dienten: Die mechanische Zerkleinerung im Mörser mit Hilfe von 4 ml Kochsalzlösung sowie die Beschallung mit einem Ultraschallgerät (Sonifier S 75 der Fa. Branson Instr. Inc.) eine halbe Minute lang führten zum Aufschluß der Membranen. Die abschließende Zentrifugierung (3ooo U/min., 1o min. lang) lieferte den antigenhaltigen Überstand.

Behandlung der Versuchstierseren: Eine halbstündige Erhitzung im Wasserbad (56^{o}) inaktivierte die Seren.

Durchführung des HAH-Tests: Aus technischen Gründen fand das Mikro-Testsystem Verwendung (Mikrotestplatten der Fa. Falcon), wobei je Serumprobe 2 Verdünnungsreihen in Zweierpotenzen mit physiologischer Kochsalzlösung bis zur Stufe 1 : 265 angelegt wurden. Die Bindungszeit zwischen dem Antigen, das auf 4 hämagglutinierende Einheiten eingestellt war, und dem Serum betrug eine Stunde (37^{o}). Nach Zugabe der einprozentigen Erythrozytensuspension erfolgte abermals eine Inkubation bei Brutschranktemperatur (1/2 Stunde). Folgende Kontrollen liefen bei jedem Ansatz mit: Versuchstierserum-, Normalserum-, Immunserum-, und Erythrozytenkontrolle. HAH-Titer ab 1 : 4 wurden als spezifisch gewertet.

Neutralisationstest

Wegen der geringen Serum-Mengen hatte der N-Test als Mikrotest stattzufinden. Da ein solcher für Vaccinia-Virus nicht standardisiert ist, mußte er in Vorversuchen eigens ausgearbeitet werden. Vergleichende Antikörpertitrationen von Testseren im Makrosystem (Plaque-Reduktions-Test) bildeten hierbei die Grundlage. Zur quantitativen Antikörpermessung bot sich die Serumverdünnungsmethode an.

Herstellung des Antigens: Die 14. RK_{13}-Passage des Stammes Elstree diente in einer Verdünnung von 1 : 10000 als Gebrauchsverdünnung (≙ 4 - 7 plaquebildende Einheiten (PBE) im Mikrosystem, 50 - 60 PBE im Makrosystem).

Verdünnungsmittel: Medium 199.
Zellsystem: RK_{13}-Zellen.
Behandlung der Seren: Vor dem Test erfolgte eine 30 min. lange Inaktivierung im Wasserbad bei 56°.
Zellkulturgefäße: Mikroplatten der Firma Falcon (N 3040). Während der Inkubation im Brutschrank dienten luftdicht abschließende Folien als Deckel. Beim Makrosystem erwiesen sich Kunststoffzellkulturfläschchen mit Schraubverschluß als vorteilhaft.
Fixierung und Färbung: Eine Formalin-Kristallviolett-Lösung nach Witte (1971) wirkte einen halben Tag auf die Zellkulturen.

Durchführung der Makromethode: Diese wurde in RK_{13}-Zellen in Plastik-Fläschchen angewendet. Die Herstellung der Neutralisationsgemische fand in Röhrchen statt, indem 0,5 ml der jeweiligen Serumverdünnung (bis 1 : 512) zu gleichen Teilen mit der Virusgebrauchsverdünnung (100 - 120 plaque-bildende Einheiten, 0,5 ml) gemischt wurden. Die Bindungszeit betrug 2 Std. (Brutschrank, 37°).

Von diesem Gemisch kamen o,5 ml in jeweils 2 Zellkulturflaschen. Nach einer Adsorptionszeit von 2 Std. bei 37° wurde das Inokulum entfernt. Im Anschluß an das Waschen der Kultur mit PBS (Phosphat-gepufferte Salzlösung) erfolgte die Überschichtung mit dem Overlay (5o % 2-prozentiger Difco-Agar und 5o % doppeltes Medium). Die Auswertung der Kulturen fand nach 3 Tagen Inkubation im Brutschrank statt. Als Kriterium galt eine im Schnitt der beiden Fläschchen 9o%ige Reduktion der Plaque-Zahl im Vergleich zur Kontrolle.

Durchführung der Mikromethode: Die Serumverdünnungen erfolgten direkt in den Mikroplatten mit genormten Mikrodilutern (o,o25 ml). Nach Zugabe der Virusgebrauchsverdünnung (o,o25 ml) betrug die Bindungszeit 2 Stunden (Brutschrank, 37°). Danach wurde die Zellsuspension eingesät (o,1 ml), die Platten mit Folie abgedeckt und in den Brutschrank gestellt. 2 Tage später - nach völliger Lysis des Zellrasens in den Viruskontrollen - wurde ausgewertet.
Als neutralisierend galt eine Serumverdünnungsstufe (bei 3 Verdünnungsreihen je Probe), wenn mindestens 2 von 3 Zellkulturlöchern einen überwiegend intakten Zellrasen aufwiesen. Die Serumtiter stimmten dann mit den im Plaque-Reduktionstest erzielten Werten genau überein. Bei einer Auswertung der Mikroplatten zu einem früheren oder späteren Zeitpunkt differierten die Ergebnisse von denjenigen des Plaque-Reduktionstests. Ein Neutralisationstiter ab 1 : 16 wurde als spezifisch angesehen.

3.2. Versuche und Ergebnisse

3.2.1. Untersuchungen über die Antikörperbildung in röntgenbestrahlten Mäusen nach einer Infektion mit dem Vaccinia Stamm Elstree

Vom WHO-Referenzstamm Elstree ist bekannt, daß er im Organismus von Versuchstieren eine Immunreaktion auslöst, die sich mit Hilfe der Antikörperbestimmung nachweisen läßt (Prasad und Hedström, 1974; Hochstein-Mintzel et al., 1972). Die Infektion mit diesem Stamm diente in dem Versuch somit als Modell für eine Vacciniavirus-induzierte humorale Abwehrreaktion im normalen bzw. im ganzkörperbestrahlten Organismus.

Es wurden Gruppen zu je 1o Mäusen gebildet, die zu verschiedenen Zeitpunkten vor und nach einer GKB bzw. ohne Bestrahlung (Kontrollgruppe) mit Stamm Elstree infiziert wurden (6., 3., 1. Tag vor, 1., 3. und 6. Tag nach der Bestrahlung).
Die Infektionsdosis betrug bei intracerebraler Applikation $1o^{3,2}$ FHE-KID_{5o} in o,o5 ml, bei intraperitonealer Applikation $1o^{4,5}$ FHE-KID_{5o} in o,1 ml. Jeweils 2 Mäuse einer Gruppe wurden zur serologischen Auswertung entblutet; und zwar in der Regel am 2., 4., 7., 12. und 18. Tag p. inf..

Intracerebrale Infizierung (HAH-Test)

Die nicht bestrahlten Kontrolltiere wiesen bereits bei der Untersuchung am 12. Tag p. inf. in der HAH Antikörpertiter von 1 : 16, am 18. Tag p. inf. Werte von 1 : 32 auf.

Die 6 Tage vor und die 6 Tage nach der Bestrahlung i. cer. infizierten Mäuse ließen im Vergleich zur unbestrahlten Kontrollgruppe nur geringe Unterschiede in der Antikörpertiterhöhe und -kinetik erkennen.
Die 3 Tage bzw. 1 Tag nach der Bestrahlung i. cer. infizierten Mäuse wiesen im Verlauf der Untersuchung nur sehr schwache oder gar keine HAH-Titer auf.
In den Gruppen der 1 Tag bzw. 3 Tage vor der Bestrahlung i. cer. infizierten Tiere traten die HAH-Antikörper später als bei den nicht bestrahlten Kontrollen auf. Am 12. Tag p. inf. waren Titerwerte von 1 : 4 bzw. 1 : 8 (gegenüber Titern von 1 : 16 der Kontrollgruppe) zu ermitteln; am 18. Tag p. inf. lagen die entsprechenden Werte in beiden Gruppen bei 1 : 32 wie bei den Kontrolltieren.

Intracerebrale Infizierung (Neutralisationstest)

Parallel laufende Untersuchungen auf neutralisierende Antikörper führten zu vergleichbaren Ergebnissen:
Die Titer der i. cer. infizierten Kontrollmäuse lagen am 12. und 18. Tag p. inf. bei 1 : 16 bzw. 1 : 32.

6 Tage vor bzw. 6 Tage nach der Bestrahlung i. cer. infizierte Mäuse ließen bezüglich der neutralisierenden Antikörper keinen Strahleneffekt erkennen; diese entsprachen in der Höhe und im Zeitpunkt des Auftretens denjenigen der Kontrollgruppe.

3 Tage bzw. 1 Tag nach der Bestrahlung i. cer. infizierte Tiere hatten in Übereinstimmung mit den Ergebnissen des HAH-Tests keine oder nur unspezifische Neutralisations-Titer.

3 Tage bzw. 1 Tag vor der Bestrahlung i. cer. infizierte Tiere unterschieden sich in ihren Neutralisations-Titern von der nicht bestrahlten Kontrollgruppe: Bei beiden Gruppen lagen die Titer stets unter denen der Kontrolle.

Die Ergebnisse der serologischen Untersuchungen bei den i. cer. infizierten Mäusen sind in Abb. 1 dargestellt.

Intraperitoneale Infizierung (HAH-Test)

Nach intraperitonealer Infektion lagen die HAH-Titer-Werte der Kontrollgruppe bei 1 : 4 (ab 12. Tag p. inf.).

In den Versuchsgruppen zeigten sich nur bei den 6 Tage vor und 6 Tage nach der Bestrahlung infizierten Tieren schwache HAH-Titer von 1 : 8, die sich erst am 18. Tag p. inf. darstellten.

Intraperitoneale Infizierung (Neutralisationstest)

Die Neutralisationstiter der Kontrollen nach i. p. - Inokulation betrugen ab 12. Tag p. inf. 1 : 16.

Auch die bestrahlten Mäuse erreichten in allen Gruppen, die vor der Bestrahlung infiziert wurden, die N-Test-Werte der Kontrollen.

Gruppen, die nach der Bestrahlung i. p. infiziert wurden, bewegten sich bezüglich neutralisierender Antikörper im Bereich der unspezifischen Reaktionen.

Einen Überblick über die serologischen Ergebnisse nach i. p. Infektion vermittelt die Abb. 2.

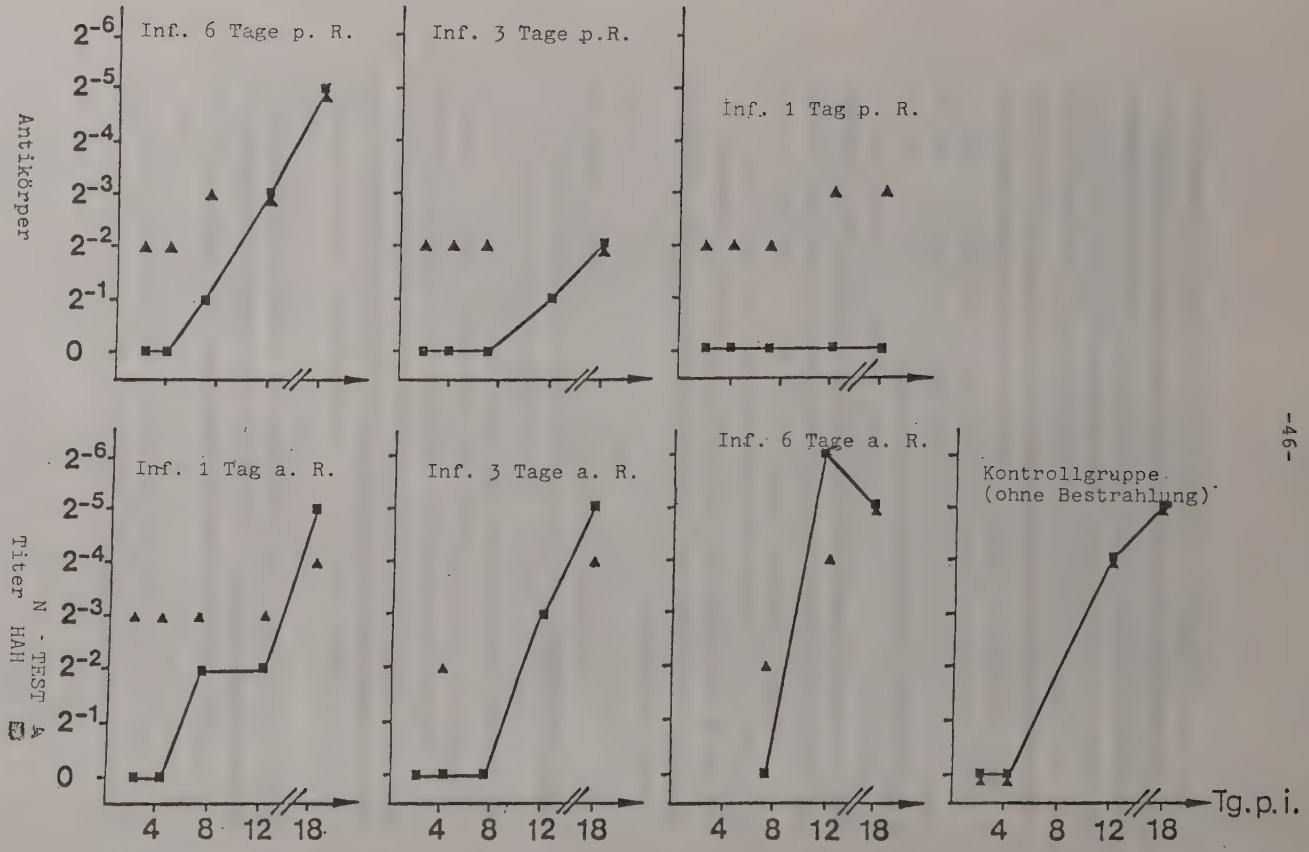

Abb. 1 Antikörperbildung nach intracerebraler Infektion mit Stamm Elstree vor und nach einer Immunsuppression

p.R.=nach der Bestrahlung
a.R.=vor der Bestrahlung

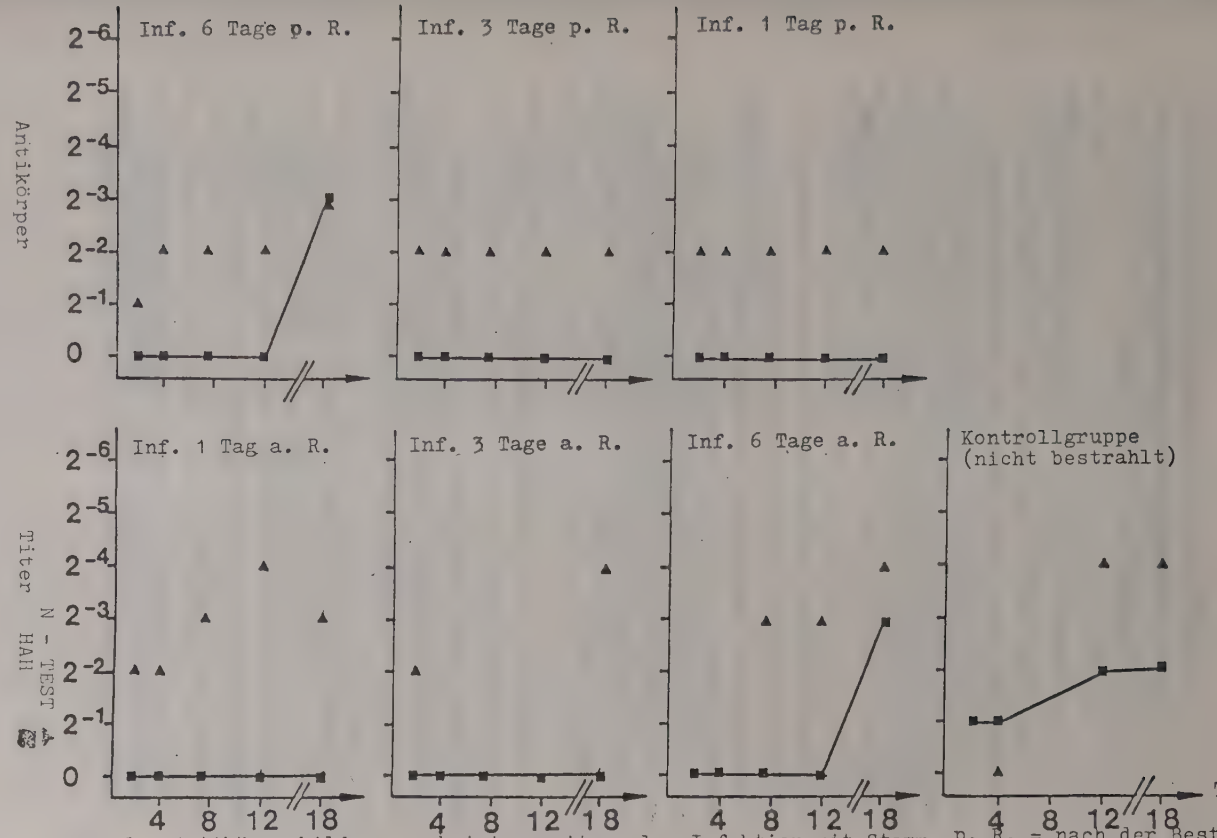

Abb. 2 Antikörperbildung nach intraperitonealer Infektion mit Stamm Elstree vor und nach einer Immunsuppression.

p. R. = nach der Bestrahlung
a. R. = vor der Bestrahlung

3.2.2. Vergleichende Untersuchungen über den klinischen Verlauf einer Vaccinia-Infektion bei der röntgenbestrahlten Maus

In diesem Versuch galt es, das Verhalten verschiedener Vaccinia-Virusstämme im immunsupprimierten Organismus zu studieren. Dabei kamen Stämme mit unterschiedlicher Virulenz zum Einsatz: Stamm M_1 zeichnet sich durch die höchste Virulenz aus, Stamm Elstree ist der von der WHO empfohlene Referenz-Impfstamm, Stamm MVA wird als avirulent eingestuft. Die Frage war nun, ob diese Graduierung auch für den röntgenbestrahlten Organismus gilt bzw. ob und wie sich die Virulenz der einzelnen Stämme unter den Bedingungen der Immunsuppression verändert. Die Virulenz eines Virusstammes wird unter anderem dadurch charakterisiert, wie viele Viruseinheiten (z.B. KID_{50}) zur Erzielung einer Erkrankung oder des Todes beim infizierten Tier benötigt werden. Eine Virulenz-Steigerung drückt sich demnach in der Erniedrigung der benötigten Virusmenge aus.

Zur Klärung der oben genannten Frage wurden die Virusstämme deshalb vergleichend in den Kontroll- und Versuchstieren austitriert, wobei als Kriterium der Virulenz die Menge (KID_{50}) des zum Erreichen einer Maus-ID_{50} bzw. -LD_{50} notwendigen Pockenvirus galt.

Versuchsanordnung: Je 4 Mäuse (eine Gruppe) wurden am 6., 3. und 1. Tag vor sowie am 1., 3. und 6. Tag nach einer Ganzkörperbestrahlung mit in Zehnerpotenzen abgestuften Virusdosen infiziert, ebenso eine unbestrahlte Kontrollgruppe (am Tag 0).

Stamm M_1 wurde i. cer. bzw. i. p. verabreicht, Stamm Elstree und Stamm MVA nur i. cer.. Die Inokula betrugen

bei i. cer. Applikation o,o5 ml, i. p. wurden o,1 ml gegeben. Die verabreichten Virussuspensionen hatten folgende Titer: Stamm M_1: $1o^{o,5}$ - $1o^{2,5}$ $KID_{5o/ml}$ (i. cer. Applikation); $1o^{2,5}$ - $1o^{6,5}$ $KID_{5o/ml}$ (i. p. Applikation); Stamm Elstree (i. cer.): $1o^{2,5}$ - $1o^{6,5}$ $KID_{5o/ml}$; Stamm MVA (i. cer.): $1o^{5,5}$ - $1o^{7,5}$ $KID_{5o/ml}$.

Die Tiere wurden ca. 3 Wochen lang täglich klinisch kontrolliert, um die Erkrankungs- und Todesraten zu ermitteln. Besonders fielen dabei generalisierte Erkrankungen ins Gewicht. ID_{5o} und LD_{5o} wurden nach Spearman (19o8) und Kärber (1931) berechnet.

Ergebnisse Stamm M_1 :

Bei intracerebraler Infektion mit M_1-Virus ist dessen Virulenz bereits bei nicht-bestrahlten Mäusen sehr hoch (eine LD_{5o} entspricht etwa einer KID_{5o}) (s. Abb. 3). Trotzdem sah man insofern eine Virulenzsteigerung bei den bestrahlten Mäusen, als bei einem Teil von ihnen der Krankheitsverlauf wesentlich heftiger war als bei den Kontrollen.

Bei i. p. infizierten Mäusen reichte in der 3 Tage nach der Infizierung bestrahlten Gruppe bereits ein Hundertstel der unter normalen Bedingungen geltenden LD_{5o} aus, um eine tödliche Erkrankung zu bewirken. (LD_{5o} unter normalen Bedingungen = $1o^{4,75}$ KID_{5o}). Die übrigen Gruppen reagierten auf Bestrahlung ebenfalls mit einer höheren Todesrate.
6 Tage nach und 6 Tage vor der Bestrahlung infizierte Tiere waren auch noch wesentlich empfindlicher gegenüber der Infektion mit Stamm M_1 als nicht bestrahlte Kontrollmäuse. Verursachte in der Kontrollgruppe erst eine Dosis

von $10^{4,75}$ KID_{50} 50 % Todesfälle, so lag diese Dosis bei den 6 Tage vor und 6 Tage nach der Bestrahlung infizierten Gruppe schon bei einer KID_{50} von $10^{3,5}$ bzw. $10^{4,0}$. Ähnlich waren die Ergebnisse bezüglich ID_{50}: Die höchste Morbiditätsrate ergab sich dann, wenn die Bestrahlung einen Tag vor der Infizierung durchgeführt wurde: Bereits $10^{2,0}$ KID_{50} entsprachen dann einer ID_{50}, im Gegensatz zu $10^{4,5}$ KID_{50} bei den Kontrolltieren. Auch für die Gruppen der 6 Tage vor oder 6 Tage nach Bestrahlung infizierten Mäuse war die Virulenz des M_1-Virus um das 10-fache gegenüber den Kontrollen erhöht (gemessen an der Morbidität).

Ergebnisse Stamm Elstree:

Bei den Kontrolltieren entsprachen $10^{4,2}$ KID_{50} einer Maus-ID_{50} und $10^{4,45}$ KID_{50} einer Maus-LD_{50}.

Bei 6 Tage vor und 6 Tage nach der Bestrahlung infizierten Mäusen konnte im Vergleich zur Kontrollgruppe praktisch kein Strahleneffekt nachgewiesen werden. Die höchste Erkrankungsrate ergab sich dann, wenn die Bestrahlung einen Tag vor der Infizierung durchgeführt wurde. Eine Dosis von $10^{1,7}$ KID_{50} reichte aus, um 50 % der betreffenden Mäusegruppe krank werden zu lassen (Unterschied zur Kontrollgruppe: 2,5 log 10). Die höchste Todesrate konnte bei einer Bestrahlung einen Tag nach der Infizierung ermittelt werden. Hier reichten $10^{3,2}$ KID_{50} aus, um die LD_{50} herbeizuführen, also 1,25 log 10 weniger als bei den Kontrolltieren. Diese Ergebnisse sind im einzelnen in Abb. 4 dargestellt.

Ergebnisse Stamm MVA:

Bei keinem der MVA-Virus infizierten Tiere kam es zu irgendwelchen klinischen Erscheinungen. Das modifizierte Vaccinia-Virus behielt seine Avirulenz auch in dem durch Bestrahlung immunsupprimierten Organismus bei, gleichgültig ob und zu welchem Zeitpunkt die Tiere bestrahlt und mit welchen Dosen sie infiziert worden waren (höchste Einzeldosis: $10^{6,2}$ KID_{50}) (s. Abb. 4).

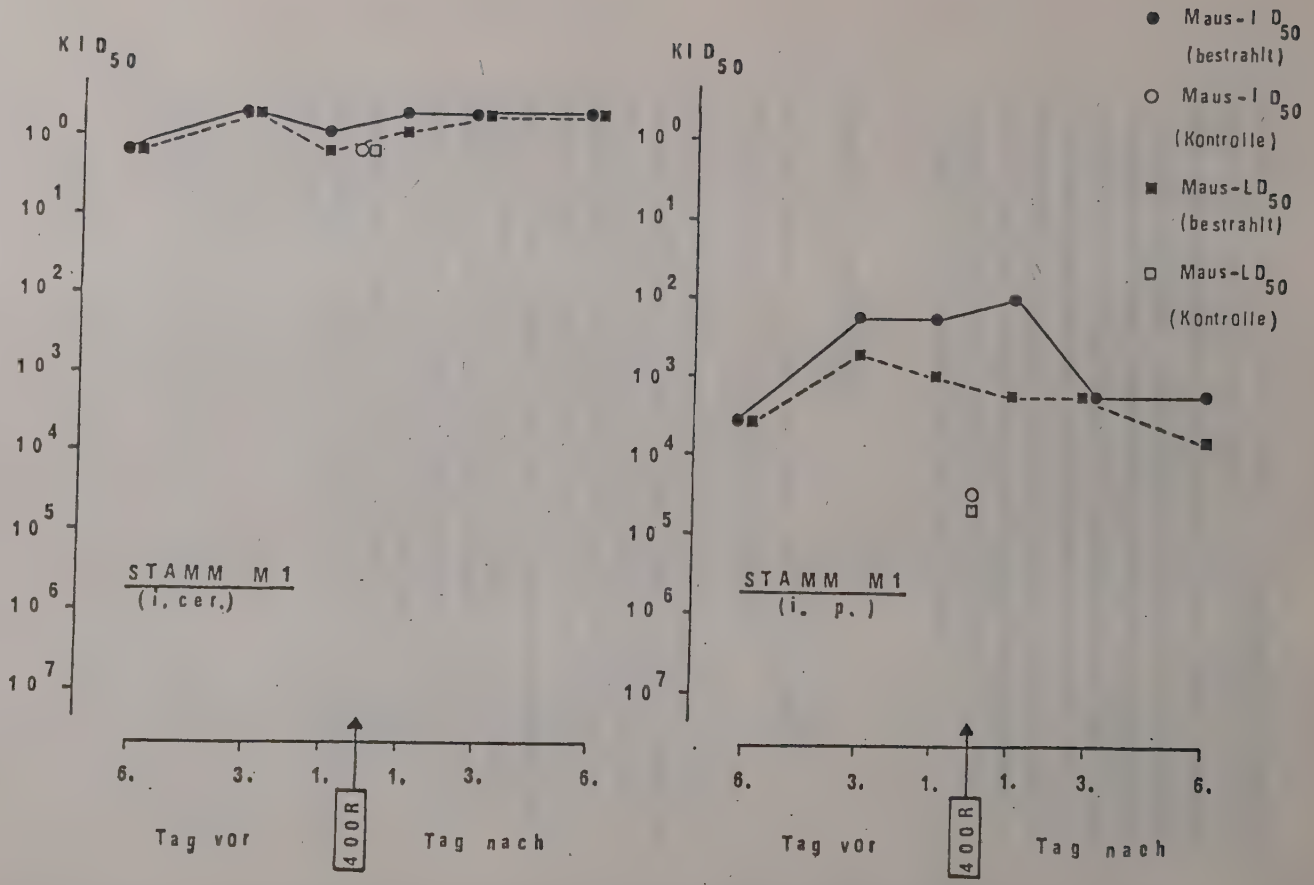

Abb. 3 Kulturinfektiöse Dosen (KID_{50}), die bei intracerebraler und intraperitonealer Infektion mit St. M_1 die Dosis letalis$_{50}$ (LD_{50}) bzw. Dosis infektionis$_{50}$ (ID_{50}) ergeben.
R = Bestrahlung

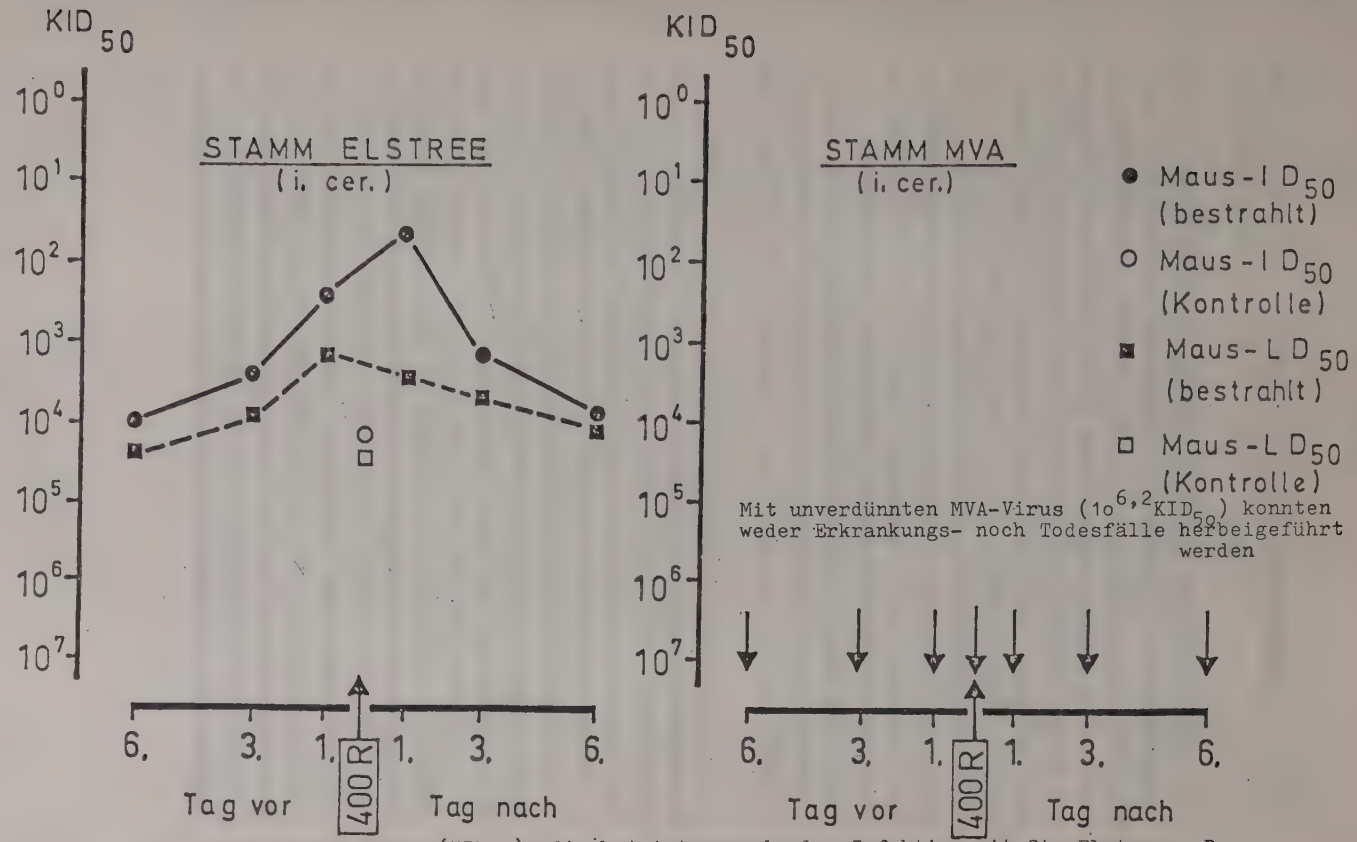

Abb. 4 Kulturinfektiöse Dosen (KID_{50}), die bei intracerebraler Infektion mit St. Elstree und St. MVA zur Dosis letalis$_{50}$ (LD_{50}) bzw. Dosis infektionis$_{50}$ (ID_{50}) führen. R = Bestrahlung

4. Diskussion

Seit Jahrzehnten hat man sich bemüht, der sehr hohen Komplikationsrate bei den Pockenimpfungen dadurch zu begegnen, daß man versuchte, abgeschwächte Pockenstämme zur Impfung einzusetzen. Einige dieser Stämme sind rel. gut charakterisiert worden: Das CV_1-Virus (Rivers, 1931), das CV_2-Virus (v. d. Noordaa, 1964), das DIS-Virus (Tagaya et al., 1961) und das MVA-Virus (Mayr et al., 1975). All diesen Viren ist gemeinsam, daß sie über zahlreiche Passagen in einem Laborsystem gezüchtet wurden und dabei ihre Virulenz schrittweise verloren haben. Die Charakterisierung dieser Virusstämme hat infolgedessen die Hauptaufgabe, deren Attenuierungsgrad zu dokumentieren und entsprechende Marker hierfür aufzustellen.

Bei einem Vergleich der verschiedenen genannten Virusarten muß man einerseits feststellen, daß die Labormarker des MVA-Virus am intensivsten erforscht sind (Mayr et al., 1975); andererseits besitzt das MVA-Virus in nahezu allen untersuchten Systemen die geringste Virulenz. Zudem ist es das einzige Virus, dessen Genom molekularbiologisch untersucht wurde und als stabil und differenzierbar gelten kann (Mayr et al., 1979).

Keiner der genannten Virusstämme ist bisher jedoch hinsichtlich seines Verhaltens im immunsupprimierten Organismus analysiert worden. Man kennt heute eine ganze Reihe von Mechanismen und Faktoren, die zur Immunsuppression führen, angefangen von psychischen Belastungen über mikrobielle Ursachen bis hin zur Katastrophensituation mit Strahlenbelastung. Das Verhalten von Impfvirus-Stämmen im immunsupprimierten Organismus erscheint des-

halb als wesentliches Kriterium für die Bestimmung der Unschädlichkeit.

Es ist seit vielen Jahren bekannt, daß sich Vaccinia-Virus in einem durch Ganzkörperbestrahlung (GKB) abwehrgeschädigten Organismus virulenter verhält als unter physiologischen Bedingungen. Man beobachtet eine erhöhte Empfänglichkeit der Versuchstiere gegenüber der Pockeninfektion. Entsprechend zeigt das inokulierte Vaccinia-Virus eine längere und stärkere Vermehrung im Sinne einer Generalisierung. Infolge der unzureichenden humoralen und zellulären Immunantwort steigt die Mortalitätsrate (Clemmesen und Andersen, 1948; Prasad und Hedström, 1974; Worthington, 1973). In den eigenen Untersuchungen sollte aufgezeigt werden, ob dies für die Vaccinia-Virusstämme generell gilt. Besonderes Augenmerk richtete sich dabei auf das Verhalten des MVA-Virus.

Zunächst brachte die Antikörperbestimmung im Serum von Mäusen, die künstlich mit Vaccinia-Virus Elstree infiziert waren, Aufschluß über die humorale Immunreaktion nach einer Ganzkörperbestrahlung. Dabei stellte sich heraus, daß nach intracerebraler Infektion der zeitliche Abstand zwischen Bestrahlung und Infizierung eine wichtige Rolle spielt: Je näher der Zeitpunkt der Infizierung an denjenigen der Bestrahlung heranrückte, desto ausgeprägter war der immunsuppressive Effekt, der sich in schwacher, fehlender oder verzögerter Antikörperbildung manifestierte. Der Tatbestand der verzögerten Antikörperbildung traf auf die 1 bzw. 3 Tage vor der Bestrahlung infizierten Gruppen zu. Diese erreichten am 12. Tag p. inf. erst Titerwerte, die noch um 2 bzw. 1 Verdünnungsstufe unter derjenigen der Kontrollgruppe lagen. Wenn der zeitliche Abstand zwischen Infektion und Bestrahlung 6 Tage betrug, ließ sich bereits kein Strahleneffekt mehr demonstrieren. Dies dürfte

im Falle der Infektion 6 Tage nach der Bestrahlung auf die schnelle Regeneration der geschädigten immunkompetenten Zellen der B-Reihe zurückzuführen sein. Bei Infektion 6 Tage vor der Bestrahlung wird der Strahleninsult vermutlich auf weniger teilungsaktive und damit weniger strahlungsgefährdete Immunzellen treffen.

Bei der intraperitonealen Applikation von Vaccinia-Virus Elstree schien die Empfänglichkeit gegenüber der Infektion stark vermindert zu sein - jedenfalls ließ sich lediglich eine schwache Antikörperreaktion feststellen. Unter diesen Umständen war es schwer, die Wirkung der Immunsuppression zu studieren. Trotzdem sah man bei den vor der Bestrahlung infizierten Gruppen einen deutlichen Strahleneffekt im Verlauf der Titer der neutralisierenden Antikörper. Marennikova und Shafikova (197o) berichteten, daß adulte bestrahlte Mäuse nur bei intracerebraler Applikation, nicht aber bei intranasaler oder intravenöser Infektion gegenüber small-pox-Virus (Stamm MT-6o) empfänglich waren.

Nachdem bewiesen war, daß die GKB mit der gewählten Dosis von 4oo R die Immunantwort gegenüber Vaccinia-Virus in spezifischer Weise verhindert bzw. hemmt, wurde der klinische Verlauf von experimentell erzeugten Vaccinia-Infektionen in der röntgenbestrahlten Maus vergleichend untersucht. Die Absicht des Versuches bestand darin, eine Antwort auf die Frage zu bekommen, wie sich die verschiedenen Vaccinia-Stämme und besonders Stamm MVA im immunsupprimierten Organismus verhalten.
Die Ergebnisse bringen deutlich zum Ausdruck, daß der neurovirulente Stamm M_1 einen hohen Virulenzgrad in der bestrahlten und nicht bestrahlten Maus erreicht. Die Mindestinfektionsdosis sowie die LD_{50} lagen bei unbestrahlten Kontrolltieren nach intracerebraler Infektion bereits bei

einer KID_{50}. Bei intraperitoneal mit M_1 infizierten Tieren war der Strahleneinfluß frappierend. Diese Tiere erreichten ihre LD_{50} bzw. ID_{50} zum Teil bereits bei einer 1oo-fach geringeren Virusdosis als die Kontrolltiere.

Eine erstaunlich hohe Virulenz entwickelte auch der von der WHO propagierte und in der Bundesrepublik als einziger Impfstamm zugelassene Stamm Elstree in der bestrahlten Maus. Während $1o^{4,45}$ kulturinfektiöse Dosen, intracerebral verabreicht, 5o % der Kontrolltiere zum Exitus brachten, sank unter immunsuppressiven Bedingungen die Mindestinfektionsdosis beträchtlich: Die LD_{50} betrug in der Gruppe der 1 Tag vor der Bestrahlung infizierten Tiere nur noch $1o^{3,2}$ KID_{50}.

Im Gegensatz zu diesen beiden Vaccinia-Stämmen ließ sich das MVA-Virus in den bestrahlten Mäusen nicht aktivieren. Weder auf die intracerebrale noch auf die intraperitoneale Inokulation folgten Erkrankungs- oder Todesfälle. Selbst nach intracerebraler Verabreichung hoher Dosen ($1o^{6,2}$ KID_{50}) reagierte keines der immunsupprimierten Tiere mit irgendwelchen Anzeichen einer Gesundheitsstörung.

Die besprochenen Versuche liefern einen weiteren Beweis dafür, daß die Anwendung des Impfstamms Elstree am Menschen ein erhebliches Risiko bedeutet. Stamm Elstree besitzt nicht nur einen relativ hohen Virulenzgrad, sondern läßt sich unter Bedingungen einer Immunsuppression auch weiter aktivieren.

Demgegenüber steht der Beweis, daß das MVA-Virus seine bekannte Avirulenz auch im abwehrgeschädigten Organismus beibehält. Damit steht für Pockenimpfungen ein durch vielfältige Labormarker gut charakterisierter und in

seiner genetischen Struktur definierter Impfstamm zur Verfügung, der auch unter den extremen Bedingungen einer Immunsuppression gefahrlos und in hoher Dosierung eingesetzt werden kann.

5. Zusammenfassung

Durch Aufhebung der Impfpflicht gegen Pocken sinkt der Pockenschutz der Bevölkerung. Damit erhöht sich nicht nur die Gefahr einer Pockeninfektion, verursacht durch Variola- oder Tierpockenviren, sondern auch das Risiko der Pocken-Schutzimpfung. Besonders gefährdet sind dann Erstimpflinge, die durch endo- oder exogene Faktoren unter Immunsuppression stehen.

Es stehen eine Reihe attenuierter Vaccinia-Virusstämme zur Verfügung, die ihre Virulenz für den Menschen weitgehend verloren haben. Ihre Eigenschaften sind durch verschiedene Labor-Marker weitgehend definiert. Bisher war jedoch nicht bekannt, wie sich die Pocken-Impfstämme im abwehrgeschädigten Organismus verhalten. Als Modell für derartige Untersuchungen wurde die mit 4oo R ganzkörperbestrahlte weiße Maus herangezogen und mit den Pockenstämmen M_1 (virulentes Virus), Elstree (von der WHO empfohlenes Impfvirus) und MVA (attenuiertes, avirulentes Impfvirus) infiziert.

Durch serologische Untersuchungen konnte zunächst bewiesen werden, daß die Röntgenbestrahlung in der gewählten subletalen Dosis die humorale Abwehr gegenüber Pockenvirus verhindert bzw. hemmt. Wesentlicher Faktor ist hierbei der zeitliche Abstand zwischen Infizierung und Bestrahlung; besonders stark ist die Strahlenwirkung wenige Tage nach der Infizierung.

Entsprechend erhöht sich bei bestrahlten Tieren auch die Virulenz des virulenten Pockenvirus M_1 sowie des Impfstammes Elstree drastisch. Im Vergleich zu den Kontrollen werden zum Teil 1o- bis 1oo-fach geringere Virusmengen

benötigt, um Erkrankung bzw. Tod herbeizuführen. Lediglich das MVA-Virus behält seine völlige Avirulenz auch im immunsupprimierten Organismus bei. Selbst bei intracerebraler Verabreichung hoher Virusdosen konnten keinerlei Anzeichen einer Gesundheitsstörung gefunden werden.

Mit dem MVA-Virus steht demnach auch für Notimpfungen unter immunsuppressiven Bedingungen ein unschädlicher Pockenimpfstamm zur Verfügung.

6. Summary

Discontinued obligatory vaccination against smallpox leads to a steadily falling level of protection of the population. Vice versa, the danger of pox infections augments. It is caused not only by the viruses of the orthopox group, but also by hazardous primo-vaccinations under immunosuppressive conditions.

A series of attenuated vaccinia strains exist with a largely diminished virulence for humans. Their characteristics are well defined by several laboratory markers. However, nothing is known so far on their behaviour in the immunosuppressed host. This thesis has used the white mouse - irradiated with 400 R - as a model for such studies. Comparative investigations have been carried out applying the vaccinia virus strains M_1 (virulent strain), Elstree (WHO reference strain for vaccinations) and the attenuated MVA strain.

Serological examinations prooved the immunosuppressive effect of the chosen irradiation dose (inhibition or prevention of antibody formation). Of significance is the time between infection and irradiation; the strongest effect is reached when irradiation is performed within a few days after the infection.

Correspondently, in irradiated animals the virulence of the virus strains M_1 and Elstree increases. Morbidity or mortality are already reached by virus amounts that are 10 to 100 fold smaller than those necessary for control animals. Only the MVA strain maintains its complete avirulence also in the immunosuppressed organism. Even after inoculation of high virus doses there were no

signs of disease.

Thus for smallpox vaccinations the MVA strain presents itself as a virus that is suitable and safe even under the conditions of an immunosuppression.

7. Literaturverzeichnis:

1. BAXBY, D., 1977:
Poxvirus hosts and reservoirs.
Arch. Virol. 55, 169.

2. BICKLE, T.A., A. PIROTTA and R. IMBER, 1977:
A simple general procedure for purifying restriction endonuclease.
Nucl. Acid. Res. 4, 2561.

3. CHERRY, J.D., K. Mc. INTOSH, J.D. CONNOR, A.S. BENENSON, D.W. ALLING, U.T. ROLFE, W.A. TODD, J.E. SCHANBERGER and M.J. MATTHEIS, 1977:
Clinical and serological study of four smallpox vaccines comparing variations of dose and route of administrations. A study sponsored by the National Institute of Allergy and Infectious Diseases. J. infect. Dis. 135, 135-186.

4. CLEMMESEN, J.K. and E.K. ANDERSEN, 1948:
Influence of roentgen radiation on the spread of vaccinia virus in young rabbits. Acta path. microbiol. Scand. 25, 615.

5. FENNER, F., 1977:
The eradication of smallpox.
Progr. med. Virol. 23, 1.

6. GANGEMI, J.D. and D.G. SHARP, 1976:
Use of a restriction endonuclease in analysing the genomes from two different strains of vaccinia virus. J. Virol. 2o, 319.

7. HOCHSTEIN-MINTZEL, V., H. HUBER und H. STICKL, 1972:
Virulenz und Immunogenität eines modifizierten Vaccinia-Virus (Stamm MVA).
Z. Immun.-Forsch. 144, 140-156.

8. HOCHSTEIN-MINTZEL, V., T. HÄNICHEN, H.Chr. HUBER und H. STICKL, 1975:
Vaccinia- und variolaprotektive Wirkung des modifizierten Vaccinia Stammes MVA bei intramuskulärer Immunisierung.
Zbl. Bakt. I. Abt. Orig. 230 A, 283.

9. JOHN, T.J., 1969:
Properties of the CV_1 strain of vaccinia virus
I. Studies in cell culture.
Arch. ges. Virusforsch. 26, 209-216.

II. Studies in eggs and mice. 366.

10. JOKLIK, W.K., 1962:
The purification of four strains of poxvirus.
Virology 18, 9.

11. KÄRBER, G., 1931:
Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche.
Arch. Exp. Path. Pharmakol. 162, 480-483.

12. KEMPE, C.H., 1968:
Smallpox vaccination of eczema patients with attenuated live vaccinia virus.
Yale. J. Biol. Med. 41, 1.

13. KITAMURA, T. and Y. KITAMURA, 1963:
Interference with the growth of vaccinia virus by an attenuated mutant virus.
Japan. J. Med. Sci. Biol. 16, 343 - 357.

14. KITAMURA, T., Y. KITAMURA und I. TAGAYA, 1967:
Immunogenicity of an attenuated strain of vaccinia virus on rabbits and monkeys.
Nature 215, 1187.

15. MARENNIKOVA, S.S. and R.A. SHAFIKOVA, 1970:
An inrease of the sensitivity of albino mice to the virus of smallpox after total γ-ray irradiation.
Bull. exp. Biol. Med. 35, 102-105, (Nr. 8).

16. MAYR, A., KALCHER., 1960:
Vergleichende Studien über die Züchtung von Geflügelpockenviren in der Zellkultur.
Arch. ges. Virusforsch. 10, 727.

17. MAYR, A., V. HOCHSTEIN-MINTZEL und H. STICKL, 1975:
Abstammung, Eigenschaften und Verwendung des attenuierten Vaccinia-Stammes MVA.
Infection 3, 6.

18. MAYR, A., 1976:
TC-Marker des attenuierten Vaccinia-Impfstammes "MVA" in menschlichen Zellkulturen.
Zbl. Vet. Med. B, 23, 417-430.

19. MAYR, A., H. STICKL, K. DANNER, H.K. MÖLLER und H. SINGER:
Der Pockenimpfstamm MVA: Marker, genetische Struktur, Erfahrungen mit der parenteralen Schutzimpfung und Verhalten im abwehrgeschwächten Organismus.
Zbl. Bakt. I Orig., B,(im Druck).

20. McCARTHY, K. and K.R. DUMBELL, 1961:
Chorioallantic inoculation of eggs.: An improved method. Virology 14, 488 - 489.

21. MORITA, M., Y. AOYAMA, M. ARITA, H. AMANO, H. YOSHIZAWA, S. HASHIZUME, T. KOMATSU, and I. TAGAYA, 1977:
Comparative studies of several vaccinia virus strains by intrathalamic inoculation into Cynomolgus-monkeys.
Arch. Virol. 53, 197-208.

22. MÜLLER, H.K., W. SCHAFFNER, R. WITTEK, A. MENNA and R. WYLER, 1977:
Genetic relationship between two poxviruses determined by restriction analysis of their DNA.
Experientia 33, 133.

23. MÜLLER, H.K., R. WITTEK, W. SCHAFFNER, D. SCHÜMPERLI, A. MENNA and R. WYLER, 1978:
Comparison of five poxvirus genomes by analysis with restriction endonucleases Hind III, BamI, and EcoRI.
J. gen. Virol. 38, 135.

24. NOORDAA, J. van der:
Primary vaccination of adults with an attenuated strain of vaccinia virus.
Thesis, Leiden, 1964.

25. NOORDAA, J. van der, F. DEKKING, J. POSTHUMA, B.J.W. BEUNDERS, 1967:
Primary vaccination with an attenuated strain of vaccinia virus.
Arch. ges. Virusforsch. 22, 210.

26. PRASAD, C.B. and K.G. HEDSTRÖM, 1974:
Study on experimental vaccinia virus infection in mice with special reference to host defence mechanisms.
Z. Imm.-Forsch. 148, 97.

27. RIVERS, T.M., 1931:
Cultivation of vaccinia virus for Jennerian prophylaxis in man.
J. exp. Med. 54, 453.

28. SPEARMAN, C., 19o8:
Zit. nach Kaerber.

29. STICKL, H., V. HOCHSTEIN-MINTZEL, A. MAYR, H.Ch. HUBER, H. SCHÄFER und A. HOLZNER, 1974:
MVA-Stufenimpfung gegen Pocken, klinische Erprobung des attenuierten Pocken-Lebendimpfstoffes, Stamm MVA.
Dtsch. med. Wschr. 99, 2386-2392.

30. TAGAYA, I., T. KITAMURA and Y. SANO, 1961:
A new mutant of dermovaccinia virus.
Nature 192, 381.

31. TAGAYA, I., H. AMANO, T. KITAMURA, T. KOMATSU, Y. UEDA, Y. TANAKA, N. UCHIDA and H. KODAMA, 1973:
Properties of an attenuated mutant of vaccinia virus strain DIS.
Symp. series immunobiol. Standard. (S. Karger), 19, 299-3o7.

32. TINT, H. and M.Z. BIERLY, 1969:
The clinical evaluations of the CV_1 vaccinia strain background and status.
Proc. Symp. on Smallpox Vacc. Yugoslav. Acad. Sci., Arts, Zagreb, p. 167.

33 . WITTE, K.H., 1971:
Microcolour test for assay of transmissible gastroenteritis virus-neutralizing antibodies.
Arch. ges. Virusforsch., 33, 171.

34 . WITTEK, R., A. MENNA, D. SCHÜMPERLI, S. STOFFEL, H. MÜLLER and R. WYLER, 1977:
HindIII and SstI Restriction Sites Mapped on Rabbit Poxvirus and Vaccinia Virus DNA.
J. of Virol. 23, 669.

35 . WORTHINGTON, M., 1973:
Mechanism of recovery from systemic infection with vaccinia virus. II. Effects of X-radiation and neonatal thymectomy.
J. inf. Dis. 127, 512.

Herrn Prof.Dr.Dr.h.c. A. Mayr danke ich vielmals für die Überlassung von Thema und Arbeitsplatz sowie für die freundlich gewährten Anregungen und Hinweise.

Bei Herrn Dr. K. Danner bedanke ich mich für die fachlichen Ratschläge, bei Frau B. von Restorff für technische Unterstützung.

Lebenslauf

Am 13.12.1950 wurde ich, Harald Singer, als erster Sohn von vier Kindern der Eheleute Heinz und Lisel Singer, geb. Machwitz, in Hannover geboren.

1956 übersiedelten meine Eltern mit mir und meinen beiden Geschwistern Detlef und Annette nach München, wo mein Vater eine Oberarztstelle im Haunerschen Kinderspittal antrat.

Von Herbst 1957 bis Juli 1962 besuchte ich in München die Volksschule an der Stuntzstraße.

Im Herbst 1962 trat ich dann in das Ludwigsgymnasium über. Dort legte ich 1971 das Abitur ab.

Im Wintersemester 1971/72 begann ich mit dem Studium der Tiermedizin, das ich im Juni 1977 mit dem Staatsexamen abschloß.

Von August 1977 bis Oktober 1978 arbeitete ich an meiner Dissertation, die ich unter der Leitung von Prof. Dr. Dr. h. c. A. Mayr im Mikrobiologischen Institut der Tiermedizinischen Fakultät über ein virologisches Thema anfertigte.

Seit 2. November 1978 bin ich als wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Kölner Universitäts-Nervenklinik, Abt. Virologie, eingestellt.